(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **161098 B**

(21) Patentansøgning nr.: **4796/87**

(22) Indleveringsdag: **14 sep 1987**

(24) Løbedag: **16 jan 1986**

(41) Alm. tilgængelig: **14 sep 1987**

(44) Fremlagt: **27 maj 1991**

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: **0215/86**

(30) Prioritet: -

(51) Int.Cl.[5] **C 07 K 15/06**
**G 01 N 33/364**
**G 01 N 33/574**
**A 61 K 39/395**
**// C 07 K 7/10**

(71) Ansøger: ***Novo Industri A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK**

(72) Opfinder: **Mogens Holst *Nissen; DK, Flemming Stig *Larsen; DK, Mogens *Christensen; DK, Jesper *Zeuthen; DK, Lars *Thim; DK**

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Antistoffer mod modificeret beta2-mikroglobulin, fremgangsmåder til detektering af modificeret beta2-mikroglobulin samt farmaceutiske præparater indeholdende sådanne antistoffer**

(56) Fremdragne publikationer

———

4796-87

(57) Sammendrag:

Tilstedeværelsen af modificeret $\beta_2$-mikroglobulin ($m\beta_2m$) med formlen I

$$\begin{array}{l} R_1\text{-Cys-}R_2\text{-X} \\ \quad\;\; | \\ \text{Y-}R_3\text{-Cys-}R_4 \end{array} \qquad \text{I}$$

hvori $R_1$ er en 24-aminosyregruppe med sekvensen Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr-Ser-Arg-His-Pro-Ala-Glu-Asn-Gly-Lys-Ser-Asn-Phe-Leu-Asn, $R_2$ er en 30-aminosyregruppe med sekvensen Tyr-Val-Ser-Gly-Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Val-Asp-Leu-Leu-Lys-Asn-Gly-Glu-Arg-Ile-Gly-Lys-Val-Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser, $R_3$ er en 20-aminosyregruppe med sekvensen Trp-Ser-Phe-Tyr-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Thr-Glu-Phe-Thr-Pro-Thr-Glu-Lys-Asp-Glu-Tyr-Ala, $R_4$ er en 19-aminosyregruppe med sekvensen Arg-Val-Asn-His-Val-Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val-Lys-Trp-Asp-Arg-Asp-Met, X er Phe, Phe-Ser, eller Phe-Ser-Lys, fortrinsvis Phe, og Y er Asp, Lys-Asp, eller Ser-Lys-Asp, fortrinsvis Asp, i legemsvæsker er en diagnostisk og/eller prognostisk markør for udviklingen af et antal lidelser, såsom forskellige cancertyper og sygdomme der involverer immunsystemet.

fortsættes

DK 161098 B

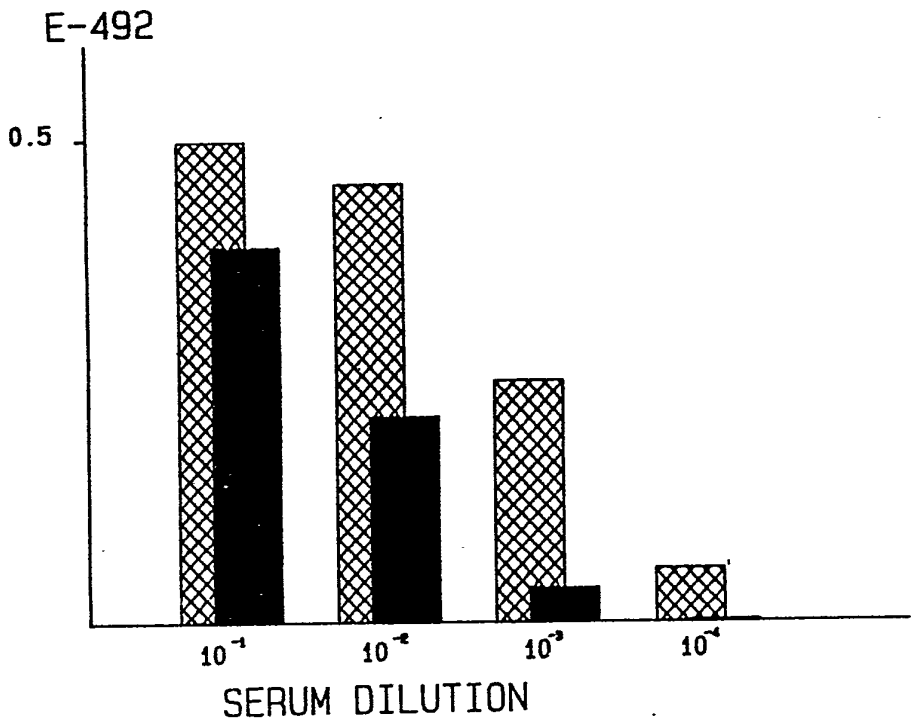
4796-87

Specifikke anti-m$\beta_2$m antistoffer anvendes ved et antal immunologiske metoder til detektering og kvantificering af m$\beta_2$m.

M$\beta_2$m dens præcursor $\beta_2$-mikroglobulin ($\beta_2$m) samt specifikke anti-m$\beta_2$m antistoffer har vist sig at have interessante farmakologiske egenskaber som biologiske responsmodificerende midler.

FIG. 1

4796-87



Opfindelsen angår generelt antistoffer rettet mod modificerede $ß_2$-mikroglobuliner ($mß_2m$) med den nedenfor anførte formel, hvilke antistoffer kan være poly- eller monoklonale, fremgangsmåder til detektering af $mß_2m$ samt farmaceutiske præparater, der indeholder anti-$mß_2m$ antistoffer.

De modificerede $ß_2$-mikroglobuliner som der ifølge opfindelsen rejses antistoffer mod, har den almene formel I:

$$\begin{array}{l} R_1\text{-Cys-}R_2\text{-X} \\ \quad\quad | \\ Y\text{-}R_3\text{-Cys-}R_4 \end{array} \qquad \text{I}$$

hvori $R_1$ er en 24 aminosyregruppe med sekvensen:
Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr-Ser-Arg-His-Pro-Ala-Glu-Asn-Gly-Lys-Ser-Asn-Phe-Leu-Asn-,

$R_2$ er en 30 aminosyregruppe med sekvensen:
-Tyr-Val-Ser-Gly-Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Val-Asp-Leu-Leu-Lys-Asn-Gly-Glu-Arg-Ile-Gly-Lys-Val-Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser-,

$R_3$ er en 20-aminosyregruppe med sekvensen:
-Trp-Ser-Phe-Tyr-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Thr-Glu-Phe-Thr-Pro-Thr-Glu-Lys-Asp-Glu-Tyr-Ala-,

$R_4$ er en 19 aminosyregruppe med sekvensen:
-Arg-Val-Asn-His-Val-Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val-Lys-Trp-Asp-Arg-Asp-Met,

-X er -Phe, -Phe-Ser, eller -Phe-Ser-Lys, fortrinsvis -Phe, og

Y- er Asp-, Lys-Asp-, Ser-Lys-Asp-, fortrinsvis Asp-,

idet summen af antallet af aminosyrerester i X og Y højest er 4.

Modificeret $ß_2$-mikroglobulin ($mß_2m$) er en variant af $ß_2$-mikroglobulin ($ß_2m$), hvilken variant er blevet opdaget i forbindelse med et antal cancertyper og immunsystemlidelser.

Dets præcursor $ß_2m$ er et serumprotein med en molekylvægt på 11.800 Daltons bestående af et enkeltkædet polypeptid med 99 aminosyregrupper med en disulfidbro mellem cysteingrup-

perne i positionerne 25 og 80, og med en kendt aminosyresekvens (1). Strukturelt fremviser $\beta_2$m en markeret homologi med det konstante område i IgG, især $C_H3$ området og $\alpha_3$ området i den tunge kæde HLA-B7. $\beta_2$m er en del af det store histokompatibilitetskompleks på cellemembraner og er i fri form til stede i legemsvæsker såsom serum, spinalvæske, spyt, sæd og kolestrum (2, 3). Hos sunde individer er serumkoncentrationen af $\beta_2$m 50 - 200 nmol/l (4).

Serumkoncentrationen af $\beta_2$m er forhøjet ved en række sygdomme f.eks. rheumatoid arthritis (RA), systemisk lupus erythomatosus (SLE), malignt lymphom (ML), og visse typer lungecancer såsom småcellet lungecancer (SLC) (5-7). Høje serum $\beta_2$m niveauer ved ML falder under påvirkning af kemoterapi, mens tilbagefald i almindelighed ikke medfølges af stigende serum $\beta_2$m.

Småcellet lungecancer (SLC) er næsten altid dissemineret på diagnosetidspunktet, og hovedbehandlingen er derfor kombinationskemoterapi. Med kemoterapi er det muligt at inducere remission hos mere end 80% af alle patienter, men i de fleste tilfælde vil tumoren senere undslippe kontrol. Den tidligst mulige diagnose, fortrinsvis på et trin hvor sygdommen er lokaliseret, kan følgelig være afgørende for at forbedre overlevelsesgraden for patienter, der lider af SLC.

Erhvervet immundefektsyndrom (AIDS) er den sluttelige kulmination for en sygdom, der øjensynlig foreligger i andre former, såsom AIDS-relateret kompleks eller lymphadenopathisyndrom, og i mindre udtrykte tilstande, inklusive bærertilstanden. Bloddonorundersøgelse med et antistof mod den formodede frembringende virus (HTLV-III/LAV) er påbegyndt. En sådan undersøgelse for viruset opdager kun en udsættelse for det, ikke tilstedeværelsen af eller en prognose for udviklingen af sygdommen. Endvidere lykkes det til tider ikke for antistofprøven for HTLV-III at detektere tilstedeværelsen af viruset (1). Der foreligger således et behov for en anden undersøgelse, der vil muliggøre en mere kvantitativ bedøm-

melse af immunsystemets respons overfor udsættelse for HTLV-III.

$\beta_2$m har modtaget megen opmærksomhed som en mulig markør, der kunne anvendes til diagnose og overvågning af sygdomme såsom de ovennævnte.

Det er således blevet rapporteret, at de fleste undersøgte AIDS-patienter har $\beta_2$m niveauer over det normale. Det er endvidere blevet rapporteret, at forøgede $\beta_2$m niveauer har vist sig i et antal tilfælde endog to år inden klinisk diagnose af AIDS.

In vitro inkubering af serum fra patienter med RA, SLE, kimcelletumorer og ML har vist sig at resultere i forekomsten af en $\beta_2$m fraktion med "$\alpha$-elektroforetisk mobilitet" ved krydset radioimmunelektroforese (CRIE). Hos patienter med ML har man fundet en omvendt korrelation mellem mængden af denne $\alpha$-fraktion og reaktion på kemoterapi.

Rhavi B. Bhalla et al.: Clinical Chemistry 31 (1985) s. 1411 har rapporteret, at den $\alpha$-elektroforetiske form af $\beta_2$m eller modificeret $\beta_2$m var til stede hos alle deres AIDS-patienter inklusive dem, der havde normale $\beta_2$m niveauer, og derudover også en patient, som var HTLV-III negativ.

Swanson et al.: Clinical Chemistry 28 (1982) s. 2033-2039 beskriver på side 2038, at deres $\beta_2$-mikroglobulin bestemmelser viser 5 forskellige former ved 2-dimensional elektroforese, alle med forskellige pI'er, men ensartede molekylvægte.

Det er således endnu ikke fastlagt, hvilken eller hvilke fraktioner, der er interessante til brug ved de ovennævnte metoder.

Den $\alpha$-elektroforetiske form eller modificeret $\beta_2$m (m$\beta_2$m) synes derfor at være yderst attraktiv som en markør for en række immunologiske lidelser. m$\beta_2$m er øjensynlig ikke

specifik for nogen af de ovennævnte sygdomme, men måling heraf vil ikke desto mindre være et værdifuldt værktøj til undersøgelse af et stort antal prøver eller til overvågning af disse sygdommes udvikling.

Følgelig har det med opfindelsen været til hensigt at udvikle midler til anvendelse af $m\beta_2m$ som generel markør ved diagnosen og bedømmelsen af prognosen for cancer og immunologiske lidelser, der manifesterer sig ved abnormale $m\beta_2m$ niveauer. Dette opnås ifølge opfindelsen ved at angive en effektiv metode til bestemmelse og måling af $m\beta_2m$ i legemsvæsker. Ved fremgangsmåden anvendes specifikke polyklonale antistoffer opnået i antisera mod $m\beta_2m$ eller specifikke epitoper derpå, eller $m\beta_2m$ specifikke monoklonale antistoffer opnået ved sammensmeltning af sådanne antistofproducerende celler med myelomceller til opnåelse af hybridomer og udvælgelse af hybridomceller, der frembringer monoklonale antistoffer, der binder sig specifikt med $m\beta_2m$.

Hidtil er der ikke blevet beskrevet nogen biologisk betydning af nogen af de i litteraturen anførte modificerede former for $\beta_2m$, men under arbejdet på opfindelsen fandtes det overraskende, at $m\beta_2m$ er biologisk aktiv som biologisk responsmodificerende middel, der forstærker immunologiske reaktioner, der allerede er blevet aktiveret, idet $m\beta_2m$ forøgede den cytotoksiske aktivitet i blandede lymphocytkulturer samt stimulerede produktionen af lymphokinen interleukin-2, og at $\beta_2m$ i denne henseende virker som præcursor for det aktive stof $m\beta_2m$, idet $\beta_2m$ øjensynlig i organismen nedbrydes til det aktive stof. Endvidere viste det sig, at $m\beta_2m$ specifikke antistoffer var i stand til at blokere den stimulerende virkning af $m\beta_2m$.

På baggrund af disse opdagelser er det ved opfindelsen også til hensigt at angive farmaceutiske præparater inde-

holdende anti-m$\beta_2$m antistoffer til brug som biologiske responsmodificerende midler.

I sit første aspekt angår opfindelsen et antistof, der er ejendommeligt ved, at det reagerer specifikt med modificeret $\beta_2$-mikroglobulin med den almene formel I:

$$\begin{array}{l} R_1\text{-Cys-}R_2\text{-X} \\ \quad\quad | \\ Y\text{-}R_3\text{-Cys-}R_4 \end{array} \qquad \text{I}$$

hvori $R_1$ er en 24 aminosyregruppe med sekvensen:
Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr-Ser-Arg-
His-Pro-Ala-Glu-Asn-Gly-Lys-Ser-Asn-Phe-Leu-Asn-,

$R_2$ er en 30 aminosyregruppe med sekvensen:
-Tyr-Val-Ser-Gly-Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Val-
Asp-Leu-Leu-Lys-Asn-Gly-Glu-Arg-Ile-Gly-Lys-Val-
Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser-,

$R_3$ er en 20-aminosyregruppe med sekvensen:
-Trp-Ser-Phe-Tyr-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Thr-Glu-Phe-Thr-
Pro-Thr-Glu-Lys-Asp-Glu-Tyr-Ala-

$R_4$ er en 19 aminosyregruppe med sekvensen:
-Arg-Val-Asn-His-Val-Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-
Val-Lys-Trp-Asp-Arg-Asp-Met,

-X er -Phe, -Phe-Ser, eller -Phe-Ser-Lys, fortrinsvis -Phe, og

Y- er Asp-, Lys-Asp-, Ser-Lys-Asp-, fortrinsvis Asp-,

idet summen af antallet af aminosyrerester i X og Y højest er 4.

Endvidere angår opfindelsen et antistof af ovennævnte art, som er ejendommeligt ved, at det er et polyklonalt antistof, og at det kan fremstilles ved immunisering af et dyr med et antigen valgt blandt modificeret $\beta_2$-mikroglobulin med den almene formel I, hvor $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, X og Y har de ovenfor nævnte betydninger, og forbindelser med den almene formel II

$$R\text{-}Z \qquad \text{II}$$

hvori R er et bæreprotein, fortrinsvis keyhole limpet hemocyanin, og Z er et peptid med formlen $R_2'$-X eller $R_3'$-Y, hvori

X og Y er som defineret ovenfor, $R_2'$ er et peptid med fra 1 til 30 aminosyregrupper svarende til et fragment fra den C-terminale ende af $R_2$ som defineret ovenfor, og $R_3'$ er et peptid med fra 1 til 20 aminosyregrupper svarende til et fragment fra den N-terminale ende af $R_3$ som defineret ovenfor,
serum isoleres, og oprenses til fuld specificitet mod modificeret $\beta_2$-mikroglobulin.

I et yderligere aspekt angår opfindelsen et monoklonalt anti-m$\beta_2$m antistof, der kan fremstilles ved dyrkning af en hybridomcellelinie, der er opnået ved sammensmeltning af myelomceller med miltceller fra dyr, der er blevet immuniseret med et antigen valgt blandt modificeret $\beta_2$-mikroglobulin med den almene formel I, hvor $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, X og Y har de ovenfor nævnte betydninger, og forbindelser med den almene formel II, hvori R og Z har de ovenfor nævnte betydninger.

I et yderligere aspekt angår opfindelsen en fremgangsmåde til detektering af m$\beta_2$m i humane legemsvæsker, ved hvilken fremgangsmåde legemsvæsken, der indeholder eller mistænkes for at indeholde modificeret $\beta_2$-mikroglobulin, bringes i kontakt med et antistof som angivet ovenfor, de herved eventuelt dannede antistof-antigen-komplekser separeres fra ikke-kompleksbundet antistof/antigen, og det detekteres om der er dannet antistof-antigen-komplekser.

I endnu et yderligere aspekt angår opfindelsen farmaceutiske præparater, der er ejendommelige ved, at det indeholder et eller flere antistoffer som angivet ovenfor, især et biologisk res[illegible]smodificerende middel.

Opfindelsen beskrives nedenfor i detaljer under henvisning til tegningen, hvori

Fig. 1 viser resultaterne af titrering ved ELISA af et antiserum ifølge opfindelsen,

Fig. 2 viser resultaterne fra den primære undersøgelse af anti-m$\beta_2$m antistofproducerende kulturer,

Fig. 3 viser resultaterne fra den sekundære undersøgelse ved ELISA af kulturer udvalgt fra den primære undersøgelse i fig. 2, og

Fig. 4 resultatet af et assay for m$\beta_2$m under anvendelse af et af de i fig. 3 angivne monoklonale antistoffer.

Modificeret $\beta_2$-mikroglobulin er defineret som den fraktion af $\beta_2$m, der har en relativ mobilitet på 2,0 i sammenligning med det native protein ved CRIE analyse.

Det modificerede $\beta_2$-mikroglobulin ifølge opfindelsen opnåedes ved at isolere det sammen med $\beta_2$m fra serumprøver fra patienter med histologisk verificeret småcellet anaplastisk lungecancer og efterfølgende adskillelse fra $\beta_2$m.

Isolering af m$\beta_2$m og $\beta_2$m fra serumet udførtes ved gelfiltrering efter 5 dages inkubation ved 20°C.

Fraktioner indeholdende m$\beta_2$m og $\beta_2$m kromatofokuseredes ved pH 7-4 for at adskille m$\beta_2$m fra $\beta_2$m, og den m$\beta_2$m holdige fraktion rensedes efterfølgende ved gelfiltrering.

m$\beta_2$m karakteriseredes fysisk-kemisk og biokemisk ved CIE, CRIE, natriumdodecylsulfatpolyacrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) og analytisk isoelektrisk fokusering (IEF) og fandtes at svare til den $\alpha$-elektroforetiske form af $\beta_2$m eller m$\beta_2$m som angivet i Fig. 4 B, s. 630, i Plesner: Allergy 35 (1980) s. 627-637.

M$\beta_2$m havde en tilsyneladende molekylvægt på 15.000 i ikke-reduceret form, og opspaltes i to mindre peptider med

molvægt under 12.000 i reduceret form ved SDS-PAGE analyse. I ikke-reduceret form havde m$\beta_2$m et pI på 5,3 ved analytisk IEF.

Det isolerede m$\beta_2$m underkastedes aminosyresekventering og fandtes at bestå af en blanding af peptider med den almene formel I

```
 R1-Cys-R2-X
     |                                   I
Y-R3-Cys-R4
```

hvori $R_1$ er en 24 aminosyregruppe med sekvensen: Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr-Ser-Arg-His-Pro-Ala-Glu-Asn-Gly-Lys-Ser-Asn-Phe-Leu-Asn,

$R_2$ er en 30 aminosyregruppe med sekvensen: Tyr-Val-Ser-Gly-Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Val-Asp-Leu-Leu-Lys-Asn-Gly-Glu-Arg-Ile-Gly-Lys-Val-Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser,

$R_3$ er en 20-aminosyregruppe med sekvensen: Trp-Ser-Phe-Tyr-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Thr-Glu-Phe-Thr-Pro-Thr-Glu-Lys-Asp-Glu-Tyr-Ala

$R_4$ er en 19 aminosyregruppe med sekvensen: Arg-Val-Asn-His-Val-Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val-Lys-Trp-Asp-Arg-Asp-Met,

-X er -Phe, -Phe-Ser, eller -Phe-Ser-Lys, fortrinsvis -Phe, og

Y- er Asp-, Lys-Asp-, Ser-Lys-Asp-, fortrinsvis Asp-, idet summen af antallet af aminosyrerester i X og Y højest er 4.

Aminosyresekvensen for $R_1$-Cys-$R_2$-X-kæden (A-kæden) er identisk med den i (1) offentliggjorte sekvens af grupperne 1-56 (58) i det native $\beta_2$m med den eneste undtagelse af aminosyrerest 42, hvor resten ifølge opfindelsen er Asn, hvorimod den offentliggjorte sekvens angiver Asp. Sekvensen ifølge opfindelsen er imidlertid i overensstemmelse med den sekvens, der udledtes ud fra klonet cDNA af Suggs et al.:Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>78</u> (1981) s. 6613-6617, som også angiver Asn i position 42.

Sekvensen for den C-terminale ende af $R_1$-Cys-$R_2$-X-kæden bestemmes både ved Edman nedbrydning fra den N-terminale ende og ved carboxypeptidasenedbrydning fra den C-terminale ende, og det fandtes, at produktet i overvejende grad bestod af det peptid, hvor X er Phe. Den C-terminale bestemmelse kompliceredes af tilstedeværelsen af srinrester i positionerne 52, 55 og 57.

Aminosyresekvensen for Y-$R_3$-Cys-$R_4$-kæden (B-kæden) er identisk med resterne (57) 59 - 99 i den i (1) offentliggjorte sekvens fro nativ $\beta_2$m, idet Y overvejende var Asp.

Det til immuniseringen anvendte antigen kan være m$\beta_2$m , men andre antigener, der er udvalgt for deres evne til at rejse anti-m$\beta_2$m antistoffer, der specifikt vil binde sig til epitoper på m$\beta_2$m, kan også anvendes. Generelt kan der anvendes antigener med den almene formel II

R-Z II

hvori R er et bærerprotein, og Z er et peptid med formlen $R_2$'-X eller $R_3$'-Y, hvori X og Y er defineret som ved formel I, $R_2$' er et peptid med fra 1 til 30 aminosyrerester svarende til et fragment fra den C-terminale ende af $R_2$, som defineret i formel I, og $R_3$' er et peptid med fra 1 til 20 aminosyrerester svarende til et fragment fra den N-terminale ende af $R_3$, som defineret i formel I.

I ét tilfælde anvendtes et antigen omfattende aminosyregrupperne -Lys-Val-Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser-Phe med en fri C-terminal ende og den N-terminale ende koblet til keyhole limpet hemocyanin (KLH) med succes til fremstilling af anti-sera samt monoklonale antistoffer, der binder sig specifikt til epitoper i de ni C-terminale aminosyregrupper i A-kæden på m$\beta_2$m.

Immuniseringen udførtes i mus ved subkutan injektion af antigenet adskillige gange og efterfølgende boosting intravenøst med antigenet. Efter passende tidsrum aflivedes musene og deres milt fjernedes til sammensmeltning med myelomceller. De sammensmeltede celler afledtes efter R.T. Taggart og I.M. Samloff: Science 219 (1983) s. 1228 - 1230 ($APRT^+$ selektion), som beskrevet nedenfor.

Undersøgelsen af de udvalgte hybridomkulturer for specifikke monoklonale antistoffer udførtes med et ELISA, og der fandtes et antal kloner, der reagerede specifikt med $m\beta_2m$ uden krydsreaktion med $\beta_2m$.

Antistofferne ifølge opfindelsen kan anvendes i fremgangsmåder til detektering af tilstedeværelsen af $m\beta_2m$ og også til at anslå de tilstedeværende mængder kvantitativt.

Detekteringen af tilstedeværelsen af det fuldstændige $m\beta_2m$ antigen eller dets karakteristiske epitop, kan udføres i kilder eller prøver af legemsvæsker såsom serum, blod, spyt, urin, sæd, spinalvæske, kolostrum, væv, vævsprøver, bronchial skylleväske og lignende.

Detekteringen af $m\beta_2m$ på basis af specifikke antistoffer kan udføres ved immunoassays såsom de kompetitive eller immunometriske ("sandwich") typer. I et kompetitivt assay mærkes det rensede $m\beta_2m$ antigen eller molekyle, omfattende dets karakteristiske epitop, med et detekterbart mærke. Den prøve, der mistænkes for at indeholde $m\beta_2m$ antistoffet eller epitopen, inkuberes med $m\beta_2m$ antistof og mærket $m\beta_2m$ antigen og efter dannelsen af immunkomplekser separering og detektion, fastlægges niveauet af $m\beta_2m$ antigen let.

En anden type kompetitivt assay involverer immobiliseret $m\beta_2m$ antigen eller epitop og mærket $m\beta_2m$ antistof. Tilstedeværelsen af $m\beta_2m$ antigen i kilden eller prøven forhindrer binding af antistof til immobiliseret antigen eller epitop, hvorved der gives et inverst mål for tilstedeværelsen af antigen.

I et assay af kompetiv type kan antistoffet også immobiliseres på en fast fase enten inden eller efter dannelsen af immunkomplekset. F.eks. kan et andet, anti-muse IgG, antistof immobiliseret på en fast fase sættes til blandingen ved, hvad der kendes som en "dobbelt-teknik".

I et immunometrisk (sandwich) assay mærkes ét $m\beta_2m$ antistof detekterbart. Et andet antistof insolubiliseres på en fast fase. Inkuberingen af prøven med mærket og insolubiliseret antistof fører til en sandwich, hvor mængden af mærke efter fraskillelse fra ikke-bundne antistof(fer) er proportional med mængden af antigen. Immunometriske assays kan udføres på ligefrem, omvendt eller samtidig måde afhængig af rækkefølgen af tilsætning af de insolubiliserede og/eller mærkede antistoffer.

Assayet kan også være en såkaldt "dot-blot" analyse.

Til en forøget følsomhed i sandwich-systemet kan de beskrevne procedurer modificeres med biotinyleret $m\beta_2m$ antistof, der reagerer med avidin-peroxidase konjugater.

Andre trin såsom vask, omrøring, rystning, filtrering eller præassayekstraktion af $m\beta_2m$ antigen og lignende kan naturligvis tilføjes assayene alt efter ønske eller hvad, der er nødvendigt til en særlig situation.

De specifikke koncentrationer, temperaturen og inkuberingstiden samt andre assaybetingelser kan varieres afhængigt af sådanne faktorer, som koncentrationen af antigen i prøven, prøvens art og lignende. Fagmænd vil være i stand til at fastlægge operati-

ve og optimale assaybetingelser for hver bestemmelse under anvendelse af rutineeksperimenter. F.eks. kan immunoassayet udføres ved 4 - 37°C, fortrinsvis 26°C, og hvert inkuberingstrin kan vare så længe som 72 timer.

I stedet for $m\beta_2m$ antigenet eller den karakteristiske epitop er det muligt ved assays at anvende anti-idiotypiske antistoffer eller immunologisk aktive fragmenter deraf, der er fremstillet ved at rejse antistoffer mod bindingsstedet for monoklonalt $m\beta_2m$ antistof. I stedet for det specifikke $m\beta_2m$ antistof, der beskrives her, er det også muligt at anvende ækvivalente antistoffer fremstillet ved at undersøge hybridomer med antigen efter rutinemetoder. Hybridomerne fremstilles ved sammensmeltning af lymphocytter, der er sensitiviseret overfor passende renset antigen og passende myelomer.

Der findes mange bærere, hvortil antistoffet/antistofferne kan bindes, og som kan anvendes ved opfindelsen. Velkendte bæremidler inkluderer glas, polystyren, polypropylen, polyethylen, dextran, nylon, amyloser, naturligt og modificeret cellulose, polyacrylamid, agaroser og magnetit. Bæremidlets art kan enten være opløseligt i nogen grad eller uopløseligt til opfindelsens formål. Fagmænd kender mange andre passende bæremidler til binding af antistoffet/stofferne eller vil være i stand til at fastlægge sådanne ved rutineeksperimenter.

Afhængigt af den særlige udførelsesform for det omhandlede assay, kan antigenet eller et eller flere af antistofferne, kobles med et detekterbart mærke såsom et enzym, radioaktivt isotop, fluoriserende forbindelse eller metal, kemiluminiscerende forbindelse eller bioluminiserende forbindelse. Endvidere kan bindingen af disse mærker til det ønskede molekyle udføres efter standardteknikker, der er velkendte for fagmænd.

En af de måder, hvorpå det ønskede molekyle i et vilkårligt immunoassay kan mærkes detekterbar, er ved at knytte det til et enzym. Dette enzym vil for sin del, når det senere udsættes for dets substrat, reagere med substratet på en sådan måde, at der frembringes en kemisk enhed, der kan detekteres ved f.eks. spektrophotometri (ELISA system) eller fluorometri. Eksempler på enzymer, der kan anvendes som detekterbare mærker, er peberrodsperoxidase, maleat dehydrogenase, staphylococ nuclease, delta-5-steroid isomerase, gæralkoholdehydrogenase, α-glycerophosphatdehydrogenase, triosephosphat isomerase, alkalisk phosphatase, asparaginase, glucoseoxidase, β-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphatdehydrogenase, glucoamylase og acetylcholinesterase.

Tilstedeværelsen af antigen eller antistof (og som følge heraf dets tilsvarende $m\beta_2m$ antigen) kan også detekteres ved at mærke det ønskede molekyle med en radioaktiv isotop. Tilstedeværelsen af den radioaktive isotop bestemmes derefter ved sådanne midler som gammatæller eller scintillationstæller. Isotoper der er særligt anvendelige er $^{3}H$, $^{125}I$, $^{131}I$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{14}C$, $^{51}Cr$, $^{36}Cl$, $^{57}Co$, $^{58}Co$, $^{59}Fe$, $^{75}Se$, $^{111}In$, $^{99m}Tc$, $^{67}Ga$, og $^{90}Y$.

Det er også muligt at detektere tilstedeværelsen af antigenet eller antistoffet ved at mærke det ønskede molekyle med en fluorescerende forbindelse. Når det fluorescerende mærkede molekyle udsættes for lys af den passende bølgelængde kan dets tilstedeværelse detekteres ved farvestoffets fluorescens. Blandt de mest vigtige fluorescensmærkende forbindelser kan nævnes fluorescein, isothiocyanat, rhodamin, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyd og fluorescamin.

Fluorescensemitterende metalatomer såsom Eu (europium) og andre lanthanider kan også anvendes. Disse kan knyttes til det ønskede molekyle med metalchelaterende grupper såsom DTPA eller EDTA.

En anden måde, hvorpå antigenet eller antistoffet kan mærkes detekterbart, er ved at koble det til en chemiluminiscerende forbindelse. Tilstedeværelsen af det chemiluminiscerende mærkede immunologiske molekyle bestemmes derefter ved at detektere tilstedeværelsen af luminiscens, der opstår under et kemisk reaktionsforløb. Eksempler på særligt anvendelige chemilusminiscerende mærkende forbindelser, er luminol, isoluminol, aromatisk acridinester, imidazol, acridinsalt, og oxalatester.

Tilsvarende kan en bioluminiscerende forbindelse også anvendes som mærke. Bioluminiscens er en særlig type chemiluminiscens, der findes i biologiske systemer, og hvorved et katalytisk protein forøger effektiviteten af den chemiluminiscerende reaktion. Tilstedeværelsen af et bioluminiscerende molekyle kan fastlægges ved at detektere tilstedeværelsen af luminiscens. Vigtige bioluminiscerende forbindelser til mærkningsformål er luciferin, luciferase og aequorin.

En anden mulig assayteknik for $m\beta_2m$ antigen eller dets tilsvarende karakteristiske epitop er ved agglutinering, hvor $m\beta_2m$ antistof bindes på latexkugler, og tilstedeværelse af $m\beta_2m$ antigen måles ved kugleaggregering.

Alternativt kan tilstedeværelsen af $m\beta_2m$ antistof detekteres ved agglutinering af partikler overtrukket med $m\beta_2m$ antigen eller den relevante epitop.

En alternativ anvendelse af $m\beta_2m$ antistoffet er ved immunohistokemisk analyse ved anvendelse af mærket antistof.

Ved de ovennævnte fremgangsmåder til at detektere $m\beta_2m$ antigenet er det muligt at anvende et specifikt anti-$m\beta_2m$ antistof. Det er imidlertid også muligt for at forøge fremgangsmådens selektivitet at anvende kombinationer af to eller flere specifikke anti-$m\beta_2m$ antistoffer f.eks. et antistof, der er specifikt for en

epitop i den C-terminale ende af A-kæden i kombination med et antistof, der er specifikt for en epitop i den N-terminale ende af B-kæden.

De materialer, der anvendes ved de omhandlede assay, er velegnede til fremstillingen af sæt. Et sådant sæt kan omfatte en æske med rum til én eller flere beholdere såsom glas, rør og lignende, idet hver af disse beholdere omfatter et at de enkelte elementer, der skal anvendes ved en vilkårlig ønsket metode.

F.eks. kan en af disse beholdere, der er anvendelige ved immunometriske assays, omfatte monoklonalt $m\beta_2m$ antistof bundet til et bæremiddel. En anden beholder, kan indeholde opløseligt detekterbart mærket monoklonalt anti-$m\beta_2m$ antistof i lyophiliseret form eller i opløsning.

Et sæt, der er anvendeligt til et kompetiv assay, ville indeholde en første beholder indeholdende et detekterbart mærket antigen, og en anden beholder indeholdende anti-$m\beta_2m$ antistof frit eller bærebundet.

Derudover kan æsken også indeholde et antal beholdere, der hver indeholder forskellige givne antigenmængder. Disse sidstnævnte beholdere kan da anvendes til at fremstille en standardkurve til interpolering af de resultater, der opnås fra prøven, der indeholder den ukendte antigenmængde.

Under arbejdet med opfindelsen viste det sig, at renset $m\beta_2m$ forøgede den cytotoksiske aktivitet i blandede lymphocytkulturer (MLC) samt stimulerede produktionen af lymphokinen interleukin-2 (IL-2). Vekselvirkningen af $m\beta_2m$ med det store histocompatibilitetskompleks (MHC), hvori $\beta_2m$ er en normal komponent, kunne føre til aktivering af celler resulterende i f.eks. en forøget cellulær receptorexpression for generel stimulatorisk aktivitet såsom interleukin-1 (IL-1) og en forøget ekspression af receptorer for IL-2 og forhøjet endogen produktion af denne lympho-

kin. Denne biologiske aktivitet ved $m\beta_2m$ angiver en farmaceutisk anvendelighed af såvel poly- som monoklonale antistoffer mod $m\beta_2m$ som biologisk responsmodificerende middel, hvor den farmakologiske virkning vil være relateret til immunsystemets tilstand. Farmakologiske virkninger af de omhandlede antistoffer vil som nævnt tidligere kunne være som biologiske responsblokerende midler af $m\beta_2m$, hvilke virkninger kunne være relateret både til virkningen på membranniveauet på grund af $m\beta_2m$'s vekselvirkning med MHC eller kunne være relateret til $m\beta_2m$'s specifikke stimulatoriske virkning på IL-2 produktion.

Opfindelsen belyses nærmere i de følgende eksempler.

Eksempel 1

Fremstilling af polyklonale antisera

RBF/Dn-stamme mus (fra Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A.) immuniseredes tre gange med to ugers intervaller med det syntetiske peptid Lys-Val-Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser-Phe koblet via den N-terminale ende til keyhole limpet hemocyanin (KLH). Peptidkonjugatet (25 µg pr. mus i PBS, 100 µl) emulsificeredes 1:1 i Freund's fuldstændige adjuvans ved den første immunisering, og i Freund's ufuldstændige adjuvans i de følgende immuniseringer, og der blev indgivet en total på 200 µl subkutant (s.c.). Blodprøver fra immuniserede mus udtoges fra den retroorbitale plexus eller øjet, og serumprøver opnåedes efter centrifugering af prøverne efter koagulering. Serumprøvernes specificitet bedømtes ved ELISA med immunoplader (NUNC, Roskilde, Danmark) overtrukket med 1 µg/ml af enten nativt $\beta_2m$ eller $m\beta_2m$. Serumprøverne fortyndedes i tidobbelte fortyndinger ($10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$ og $10^{-4}$, og inkuberedes med de overtrukne plader, og antistofaktiviteten overfor det respektive antigen måltes kolorimetrisk med et kanin anti-museimmunoglobulin konjugeret med peberrodsperoxidase (Dakopatts, Danmark) og o-phenylendiamin (OPD) substratreaktionen.

Fig. 1 illustrerer titrering af et repræsentativt museserum analyseret for binding af $m\beta_2m$ (skraverede søjler) og nativt $\beta_2m$ (udfyldte søjler). Antiserumet reagerer på selektiv vis med $m\beta_2m$ og synes at være specifikt for $m\beta_2m$ ved fortyndinger på $10^{-4}$ under disse betingelser. Et fuldstændigt specifikt polyklonalt antiserum mod $m\beta_2m$ kunne opnås ved yderligere absorption med nativt $\beta_2m$.

Eksempel 2

Immuniserings- og fusions eksperimenter

1 mg af peptidet Lys-Val-Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser-Phe blandedes med 3 mg KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, Calbiochem) og glutaraldehyd (Merck) tilsattes til slutkoncentrationen på 0,25% v/v i en total på 1 ml. pH justeredes til 8,0. Omsætningen udførtes i en time ved stuetemperatur efterfulgt af 18 timer ved 4°C. Derefter dialyseredes blandingen mod PBS til opnåelse af konjugatet, der anvendtes som antigen ved den følgende immunisering.

Fremstilling af monoklonal antistoffer

RBF/Dn-stamme mus indeholdende RB (8.12)5Bnr Robertsonian translokation kromosomet (fra Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A.) immuniseredes tre gange med to ugers intervaller med peptidet Lys-Val-Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser-Phe koblet via den N-terminale ende til KLH. Konjugatet (25 µg pr. mus i PBS, 100 µl) emulgeredes 1:1 i Freund's fuldstændige adjuvans til den første injektion og ufuldstændigt Freund's adjuvans til de følgende injektioner og 200 µl blev indgivet subkutant (s.c). Musene blev boosted intravenøst (i.v.) med 10 µg konjugat i 100 µl PBS 30 dage efter den sidste s.c. immunisering. Efter yderligere tre dage aflivedes musene og deres milt fjernedes til fusion med myelomceller.

Miltceller fra èn RBF/Dn mus (13,3 x $10^7$ celler) smeltedes med 3,5 x $10^7$ celler af FOX-NY myelomlinien, der manglede de selekterbare enzymmarkørloci adenosinphosphoribosyltransferase ($APRT^-$) og hypoxanthinphosphoribosyltransferase ($HPRT^-$) (fra HyClone Laboratories, Logan, Utah, U.S.A.). Herved fjerner exponering af cellefusionsblandingerne for et medium, der kræver APRT-aktivitet ($APRT^+$ selektion) både ikke smeltede $APRT^-$ myelomer, og $APRT^-$ hybridomer (R.T. Taggart og I.M. Samloff: Science 219(1983) s. 1228 - 1230). De smeltede celler podedes på Balb/c-stamme musemacrophagfødelag i en total på 10 96-brøndsmikrotiterplader (NUNC, Roskilde, Danmark) i et medium bestående af RPMI-1640 med 15% w/v føtalt kalveserum (Gibco) suppleret med adenin (7,5 x $10^{-5}$ M), aminoterin (8 x $10^{-7}$ M)og thymidin (1,6 x $10^{-5}$ M), (AAT).

Kulturer inkuberedes i 7 dage ved 37°C i luft indeholdende 5% $CO_2$ inden medium erstattes med frisk medium, og efter en 4-dages inkuberingstid underkastedes kulturerne en primær undersøgelse ved et ELISA.

Undersøgelsesprocedure (ELISA)

Mikrotiterplader (NUNC Immunoplates, NUNC, Roskilde, Danmark) blev overtrukket med antigen. Det anvendte ELISA var en modifikation af den procedure der er beskrevet af A. Voller og E. de Savigny (i R.A. Thompson: Techniques in Clinical Immunology, 2. udgave (1981) s. 157 - 169. Blackwell Scientific Publications, Boston, Mass.). Overtrækningen udførtes natten over med antigenet i phosphatpufret saltopløsning (PBS), 50 µl pr. brønd. Pladerne tømtes og blokeredes med PBS indeholdende 2% w/v okseserumalbumin (BSA) 200 µl pr. brønd ved 20°C i 1 time, efterfulgt af tre vask med PBS-Tween-20 (0,05% v/v Tween-20 in PBS). Den ufortyndede overstående væske fra en hybridomkultur (50 µl pr. brønd) blev påført ved 20°C i 1 time efterfulgt af vask af pladerne som beskrevet ovenfor. Antistofaktiviteten mod det til overtrækning anvendte antigen, måltes kolorimetrisk ved inkubering ved 20°C i 1 time med 100 µg pr. brønd kanin anti-museimmunoglobulin konjugeret med

peberrodsperoxidase (Dakopatts, Danmark) fortyndet til 1:1000 i PBS indeholdende 0,5% w/v BSA og efter yderligere 3 vask i 0,1 M citrat-phosphat puffer på pH 5,0 (citronsyre monohydrat 7,3 g, $Na_2HPO_4.12H_2O$: 23,87 g fortyndet til 1 liter) og inkuberedes derefter som beskrevet ovenfor med o-phenylendiamin (OPD) substrat (o-phenylendiamin, 2HCl:8 mg; citratpuffer: 15 ml;$H_2O_2$ (30% v/v): 5 µl). Reaktionen standsedes efter 3 minutter ved tilsætning af 150 µl 1 M $H_2SO_4$ og absorbansen ved 492 nm aflæstes med et dobbeltstråle KONTRON SLT-210 fotometer (SLT, Zurich, Schweiz) med 620 nm aflæsningen som reference.

Primær undersøgelse

Under anvendelse af 10 mikrotiterplader overtrukket med det til immunisering anvendte nonapeptid, men imidlertid ikke koblet til KLH (1 µg/ml) ved den ovennævnte metode, undersøgtes 960 hybridomkultursupernatanter. 27 kulturer reagerede signifikant positivt og underkastedes yderligere afprøvning.

Fig. 2 angiver et eksempel på resultaterne af ELISA ved den primære undersøgelse. Resultaterne fra en af de ti mikrotiterplader er anført. Den vandrette linie repræsenterer et arbitrært baggrundsniveau, der er udvalgt til den primære undersøgelse. Kun de kulturer, der er mærket med x, udvalgtes til yderligere afprøvning.

Sekundær undersøgelse

Mikrotiterplader blev overtrukket med enten nonapeptidet, $\beta_2m$ (nativt) eller $m\beta_2m$ (variant) i koncentrationer på henholdsvis 1 µg/ml, 10 µg/ml og 10 µg/ml. De 27 kultursupernatanter blev tilført, og undersøgelsen udførtes efter den ovennævnte undersøgelsesprocedure.

I fig. 3 er resultaterne af den sekundære undersøgelse vist for de fra den primære undersøgelse udvalgte kulturer bortset fra kulturerne F1, F3 og F7, der var negative i den betydning, at de ikke reagerede med nogen af de ovenfor anførte antigener. Af figurerne fremgår det, at 3 kloner (F2, F10, F25) udelukkende reagerede med peptidet 15 reagerede med peptidet og $m\beta_2m$ og 3 (F5, F8, F26) reagerede med peptidet, $m\beta_2m$ og $\beta_2m$ (nativt). De resterende 3 kloner (F12, F18, F21) havde mistet reaktivitet.

Udvælgelse af hybridomer

Alle de hybridomantistoffer, der reagerede med $m\beta_2m$ og/eller $\beta_2m$ fandtes yderligere at være af museimmunoglobulin klassen IgM. Dette fandtes ved undersøgelser under anvendelse af den ovennævnte ELISA procedure med en modifikation bestående af erstatning af det peroxidasemærkede kanin anti-museimmunoglobulin med mærkede antistoffer, der var specifikke for de murine klasser og underklasser.

Eksempel 3

Enzymimmunoassay for $m\beta_2m$

Til afprøvning af anvendeligheden af de opnåede monoklonale antistoffer mod $m\beta_2m$ i assay til bestemmelse af $m\beta_2m$ indholdet i biologiske prøver konstrueredes et assay under anvendelse af antistof F19 i fig. 3.

Assayet gennemførtes efter følgende procedure:

Kanin anti-human $\beta_2m$ antistof (Dakopatts, København, Danmark) påførtes bundene i mikrotiterplader. Efter blokering af pladerne ved tilsætning af fosfatbuffer (pH 7,2) indeholdende 1% BSA og inkubation i 1 time ved stuetemperatur med efterfølgende 3 gange vask med fosfatbuffer (pH 7,2) indeholdende 0,1% Tween® sattes prøver indeholdende $\beta_2m$ eller $m\beta_2m$ til mikrotiterpladerne i forskellige koncentrationer på 20, 61, 185, 555, 1600 og 5500 ng/ml. Efter 1 times inkubation ved stuetemperatur tilsattes antistof F19, og prøverne inkuberedes i 1 time ved stuetemperatur. I næste trin inkuberedes pladerne med et peroxidasemærket

museimmunoglobulinantistof (Tago, Inc., Burlingame, Californien, U.S.A.) i en time ved stuetemperatur, og endelig fremkaldtes pladerne ved inkubation i 1 time med et peroxidase substrat bestående af OPD i citratbuffer (pH 4,5), hvorefter den frembragte farvereaktion måltes ved absorbansen ved 492 nm.

Resultaterne fra dette assay er angivet i fig. 4, der viser den målte absorbans ved 492 nm som funktion af koncentrationen af henholdsvis $\beta_2$m (punkteret linie) og m$\beta_2$m (fuld linie).

Af fig. 4 fremgår det klart, at der ved dette assay opnås en tydelig angivelse af tilstedeværelsen af m$\beta_2$m, uden at et indhold af ikke modificeret $\beta_2$m påvirker målingen.

Litteraturhenvisninger:

1. Cunningham, B.A., Wang, J.L., Berggård, I. & Peterson, P.A. (1973) Biochemistry 12, 4811 - 4822.

2. Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H. & Itakura, K. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 78, 6613 - 6617.

3. Berggård I. Bearn A.G. (1968) J.Biol.Chem. 243, 4095 - 4103.

4. Plesner T. & Bjerrum O.J. (1980) Scand.J.Immunol. 11, 341 - 351.

5. Solheim, B.G. & Thorsby, E. (1974) Nature (Lond) 249, 36 - 38.

6. Peterson P.A., Rask, L. & Lindblom, J.B. (1974) Proc.Natl.-Acad. Sci. U.S.A. 71, 35 - 39.

7. Cotner, J., Mashimo, H., Kung, P.G. Goldstein, G. & Strominger, J.L. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 78, 3858 - 3862.

8. Terhorst, C., Agthoven, v.A., LeClair, K., Snow, P., Reinherz, E. & Schlossman, S. (1981) Cell 23, 771 - 780.

9. Peterson, P.A., Cunningham, B.A., Berggård, I. & Edelman, G.M. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 69, 1697 - 1701.

18. Plesner, T., Wilken, M., Bjerrum, O.J. & Hansen, M.M. (1982) J.Clin.Lab.Immunol. 8, 137 - 414.

19. Weeke, B. (1973) in Manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications. lst edn. (Axelsen, N.H., Krøll, J. & Weeke, B., eds.) s. 47 - 56, Universitetsforlaget, Oslo.

20. Plesner, T., Nørgaard-Pedersen, B. & Boenisch T. (1975) Scand.J. Clin.Lab.Invest 35, 729 - 735.

22. Wycoff, M., Rodbard, A. & Chrambach, A. (1977) Anal.Biochem. 78, 459 - 482.

23. Bury, A.F. (1981) J.Chromatography 213, 491 - 500.

25. Moody, A.J., Thim, L. & Valverde, I. (1984) FEBS Lett. 172, 142 - 148.

**PATENTKRAV**

1. Antistof, k e n d e t e g n e t ved, at det reagerer specifikt med modificeret $ß_2$-mikroglobulin med den almene formel I:

$$\begin{array}{l} R_1\text{-Cys-}R_2\text{-X} \\ \quad\quad | \\ Y\text{-}R_3\text{-Cys-}R_4 \end{array} \qquad \text{I}$$

hvori $R_1$ er en 24 aminosyregruppe med sekvensen:
Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr-Ser-Arg-
His-Pro-Ala-Glu-Asn-Gly-Lys-Ser-Asn-Phe-Leu-Asn-,

$R_2$ er en 30 aminosyregruppe med sekvensen:
-Tyr-Val-Ser-Gly-Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Val-
Asp-Leu-Leu-Lys-Asn-Gly-Glu-Arg-Ile-Gly-Lys-Val-
Glu-His-Ser-Asp-Leu-Ser-,

$R_3$ er en 20-aminosyregruppe med sekvensen:
-Trp-Ser-Phe-Tyr-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Thr-Glu-Phe-Thr-
Pro-Thr-Glu-Lys-Asp-Glu-Tyr-Ala-

$R_4$ er en 19 aminosyregruppe med sekvensen:
-Arg-Val-Asn-His-Val-Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-
Val-Lys-Trp-Asp-Arg-Asp-Met,

-X er -Phe, -Phe-Ser, eller -Phe-Ser-Lys, fortrinsvis -Phe, og

Y- er Asp-, Lys-Asp-, Ser-Lys-Asp-, fortrinsvis Asp-,

idet summen af antallet af aminosyrerester i X og Y højest er 4.

2. Antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det er et polyklonalt antistof, og at det kan fremstilles ved immunisering af et dyr med et antigen valgt blandt modificeret $ß_2$-mikroglobulin med den almene formel I, hvor $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, X og Y har de i krav 1 nævnte betydninger, og forbindelser med den almene formel II

$$R\text{-}Z \qquad \text{II}$$

hvori R er et bæreprotein, fortrinsvis keyhole limpet hemocyanin, og Z er et peptid med formlen $R_2'$-X eller $R_3'$-Y, hvori

X og Y er som defineret i krav 1, $R_2'$ er et peptid med fra 1 til 30 aminosyregrupper svarende til et fragment fra den C-terminale ende af $R_2$ som defineret i krav 1, og $R_3'$ er et peptid med fra 1 til 20 aminosyregrupper svarende til et fragment fra den N-terminale ende af $R_3$ som defineret i krav 1, serum isoleres, og oprenses til fuld specificitet mod modificeret $\beta_2$-mikroglobulin.

3. Antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det er et monoklonalt antistof, og at det kan fremstilles ved dyrkning af en hybridomcellelinie, der er opnået ved sammensmeltning af myelomceller med miltceller fra dyr, der er blevet immuniseret med et antigen valgt blandt modificeret $\beta_2$-mikroglobulin med den almene formel I, hvor $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, X og Y har de i krav 1 nævnte betydninger, og forbindelser med den almene formel II, hvori R og Z har de i krav 2 nævnte betydninger.

4. Antistof ifølge krav 1, 2, eller 3, k e n d e t e g n e t ved, at det er koblet til et detekterbart mærke, såsom et enzym, radioaktiv isotop, fluorescerende forbindelse, eller metal, kemiluminescerende eller bioluminescerende forbindelse, fortrinsvis et enzym.

5. Antistof ifølge krav 1, 2, eller 3, k e n d e t e g n e t ved, at det er bundet til en uopløselig fast fase.

6. Fremgangsmåde til detektering af modificerede $\beta_2$-mikroglobuliner i humane legemsvæsker, k e n d e t e g n e t ved, at legemsvæsken, der indeholder eller mistænkes for at indeholde modificeret $\beta_2$-mikroglobulin, bringes i kontakt med et antistof ifølge krav 1, 4 eller 5, at de herved eventuelt dannede antistof-antigen-komplekser separeres fra ikke-kompleksbundet antistof/antigen, og at det detekteres om der er dannet antistof-antigen-komplekser.

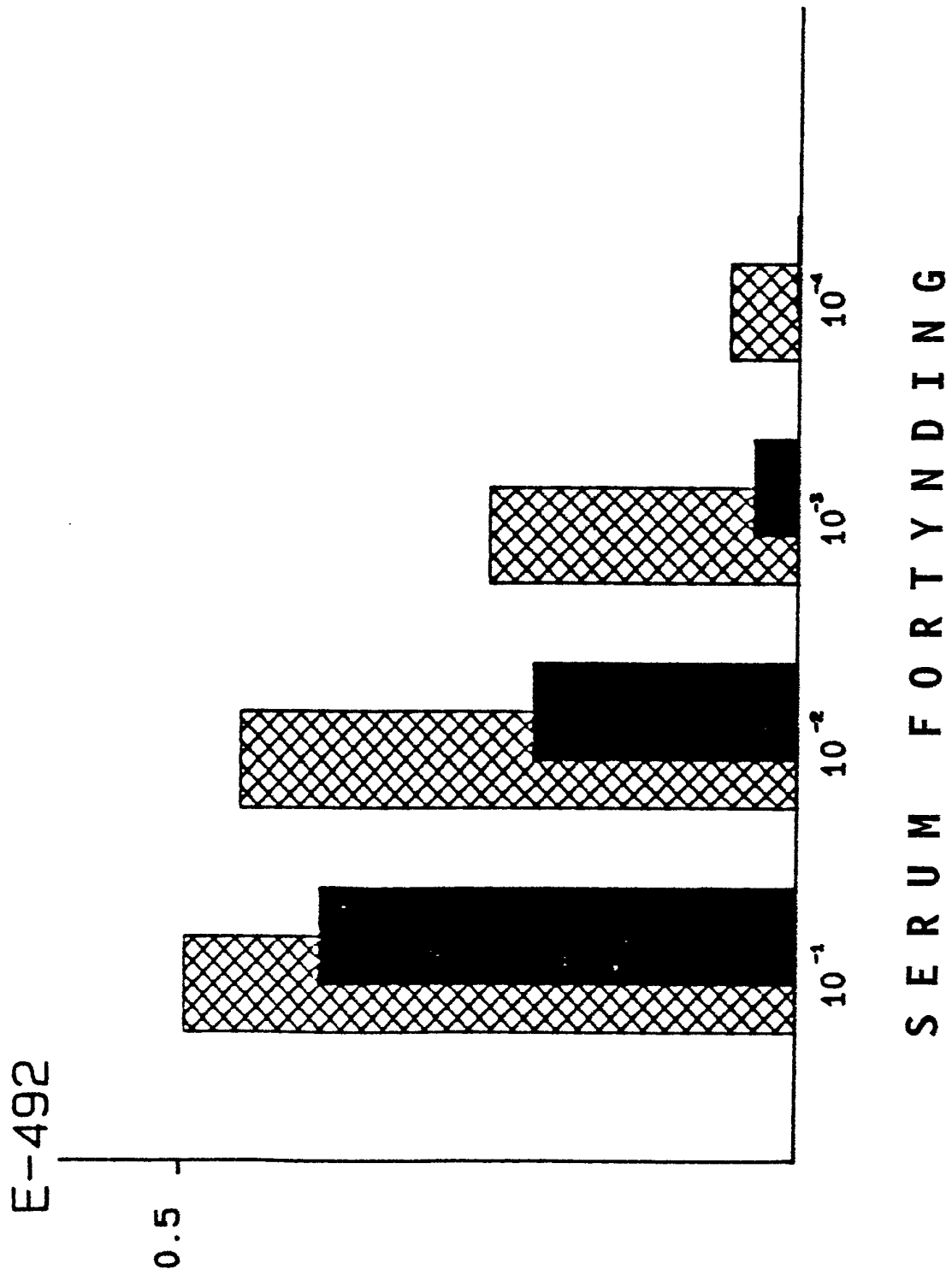
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at fremgangsmåden er et kompetitivt assay.

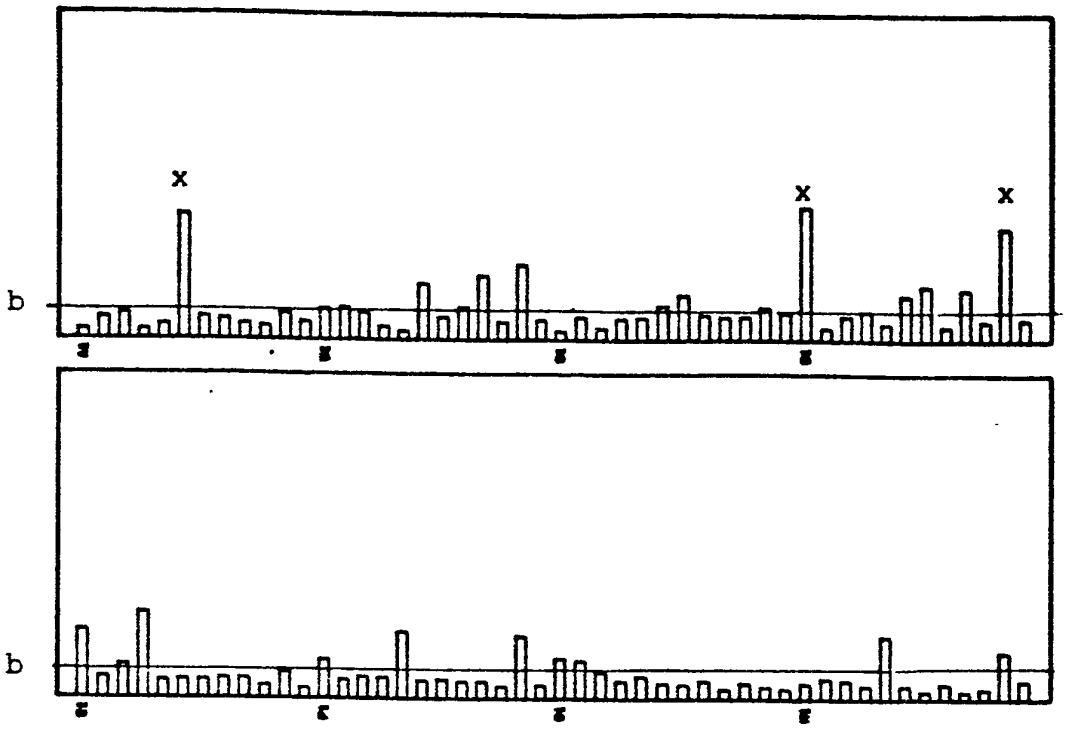
8. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at fremgangsmåden er et immunometrisk assay.

9. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder et eller flere antistoffer ifølge et vilkårligt af kravene 1 til 5.

10. Farmaceutisk præparat ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at det er et biologisk responsmodificerende middel.

FIG. 1

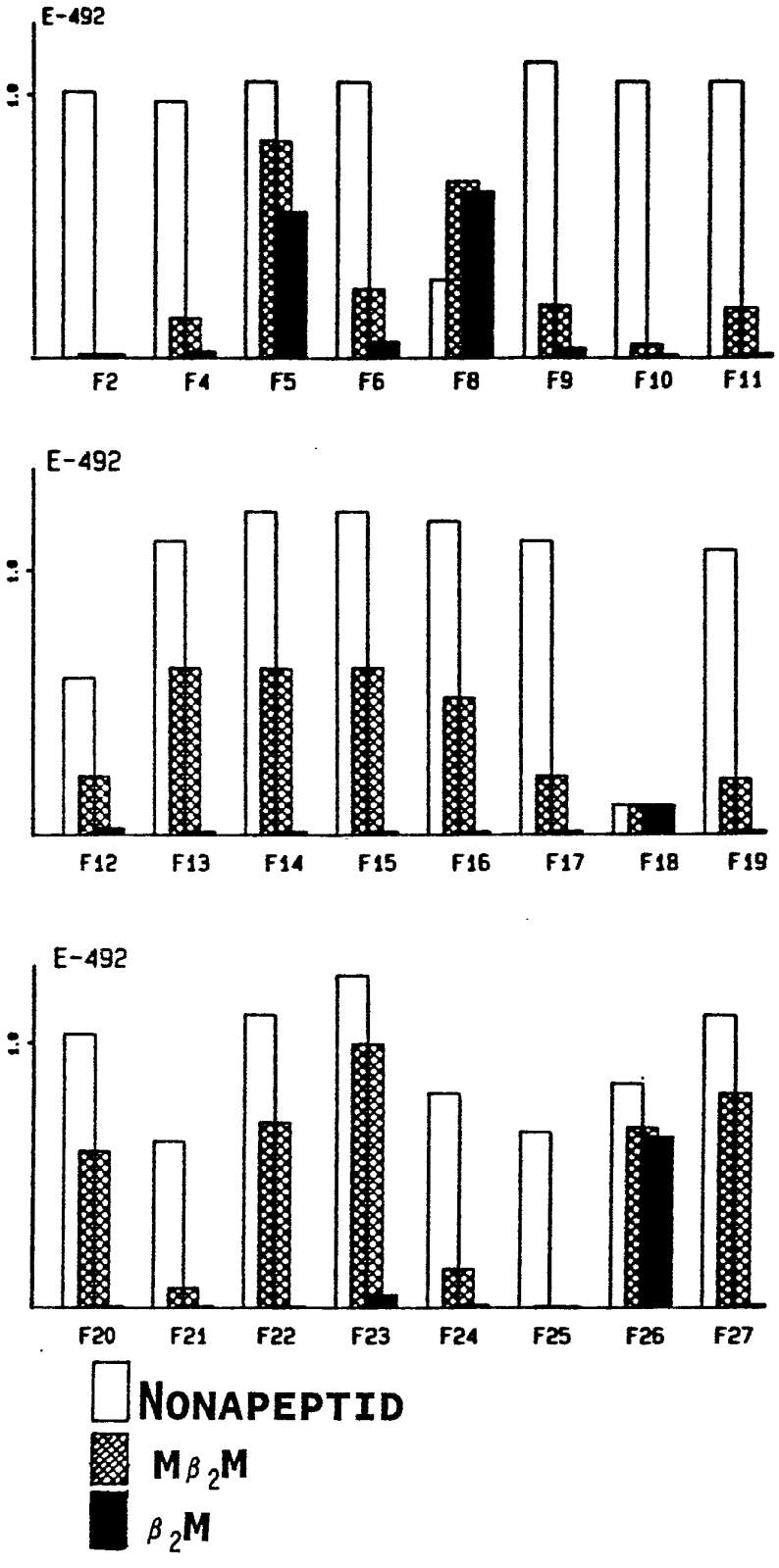




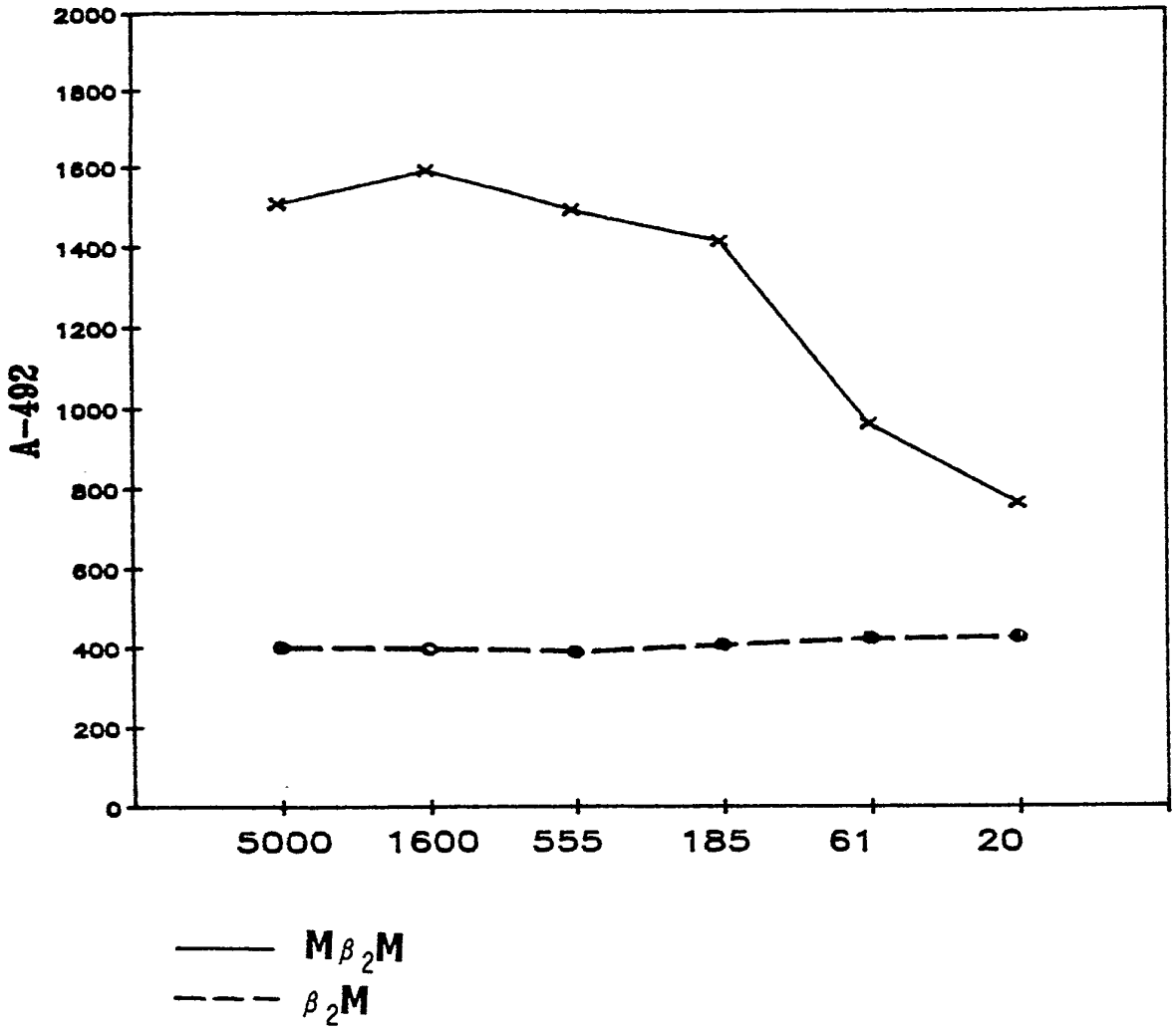

b = **Arbitrært baggrundsniveau**

F I G. 2

F I G. 3


E-492
F2
F4
F5
F6
F8
F9
F10
F11
E-492
F12
F13
F14
F15
F16
F17
F18
F19
E-492
F20
F21
F22
F23
F24
F25
F26
F27
NONAPEPTID
Mβ2M
β2M

F I G. 4


2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
A-492
5000
1600
555
185
61
20
Mβ2M
β2M