



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0215/86

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

C 07 K 7/10

(22) Indleveringsdag: 16 jan 1986

A 61 K 39/395

(41) Alm. tilgængelig: 14 sep 1987

(44) Fremlagt: 06 maj 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

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

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

\*Christensen; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Modificerede beta2-mikroglobuliner og farmaceutiske præparater indeholdende disse**(56) Fremdragne publikationer

DE pat. nr. 2934756

GB off.g.skrift nr. 2030294

Andre publikationer. Clinical Chemistry, bind 31, Nr. 8  
(1985) Side 1411-1412

(57) Sammendrag:

215-86

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



hvor  $R_1$  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-

fortsættes

215-86

Lys, fortrinsvis Phe, og Y er Asp, Lys-Asp, eller Ser<sup>t</sup>Lys-Asp, fortrinsvis Asp, i legemsvæsker er en diagnostisk og/eller prognostisk markør for udviklingen af et antal lidelser, såsom forskellige certyper og sygdomme der involverer immunsystemet.

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.

Opfindelsen angår hidtil ukendte modificerede  $\beta_2$ -mikroglobuliner ( $m\beta_2m$ ) og farmaceutiske præparater indeholdende  $m\beta_2m$ .

5 De modificerede  $\beta_2$ -mikroglobuliner ifølge opfindelsen har den almene formel I:



10 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-  
15 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:

20 -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-,

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

Modificeret  $\beta_2$ -mikroglobulin ( $m\beta_2m$ ) er en variant af  $\beta_2$ -mikroglobulin ( $\beta_2m$ ), hvilken variant er blevet opdaget i forbindelse med et antal cancertyper og immunsystemlidelser.

30

Dets præcursor  $\beta_2m$  er et serumprotein med en molekylvægt på 11.800 Daltons bestående af et enkeltkædet polypeptid med 99 aminosyregrupper med en disulfidbro mellem cysteingroupperne i positionerne 25 og 80, og med en kendt aminosyresekvens (1).

35 Strukturelt fremviser  $\beta_2m$  en markeret homologi med det konstante område i IgG, især  $C_H3$  området og  $\alpha_3$  området i den tunge kæde HLA-B7.  $\beta_2m$  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  $\beta_2m$  50 - 200 nmol/l (4).

Serumkoncentrationen af  $\beta_2m$  er forhøjet ved en række  
5 sygdomme f.eks. rheumatoid arthritis (RA), systemisk lupus erytho-  
matosus (SLE), malignt lymphom (ML), og visse typer lungecancer  
såsom småcellet lungecancer (SLC) (5-7). Høje serum  $\beta_2m$  niveauer  
ved ML falder under påvirkning af kemoterapi, mens tilbagefald i  
almindelighed ikke medfølges af stigende serum  $\beta_2m$ .

10 Småcellet lungecancer (SLC) er næsten altid dissemineret  
på diagnosetidspunktet, og hovedbehandlingen er derfor kombina-  
tionskemoterapi. Med kemoterapi er det muligt at inducere remis-  
sion hos mere end 80% af alle patienter, men i de fleste tilfælde  
vil tumoren senere undslippe kontrol. Den tidligst mulige diag-  
15 nose, 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  
20 former, såsom AIDS-relateret kompleks eller lymphadenopathi-  
syndrom, og i mindre udtrykte tilstande, inklusiv bærertilstan-  
den. Bloddonorundersøgelse med et antistof mod den formodede  
frembringende virus (HTLV-III/LAV) er påbegyndt. En sådan undersø-  
gelse for viruset opdager kun en udsættelse for det, ikke tilste-  
25 deværelsen 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 bedømmelse af immunsystemets respons overfor  
30 udsættelse for HTLV-III.

$\beta_2m$  har modtaget megen opmærksomhed som en mulig markør,  
der kunne anvendes til diagnose og overvågning af sygdomme såsom  
de ovennævnte.

35

Det er således blevet rapporteret, at de fleste under-  
søgte AIDS-patienter har  $\beta_2m$  niveauer over det normale. Det er  
endvidere blevet rapporteret, at forøgede  $\beta_2m$  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  $\beta_2m$  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  $\beta_2m$  eller modificeret  $\beta_2m$  var til stede hos alle deres AIDS-patienter inklusive dem, der havde normale  $\beta_2m$  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.

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  $m\beta_2m$  ifølge opfindelsen forøgede den cytotoxiske 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.

På baggrund af disse opdagelser er det ved opfindelsen også til hensigt at angive farmaceutiske præparater, hvilke præparater er ejendommelige ved det i den kendetegnende del af krav 6 angivne. De er fortrinsvis biologiske responsmodificerende midler

såsom immunstimulerende eller -undertrykkende midler.

Opfindelsen beskrives nedenfor i detaljer under henvisning til tegningen, hvorpå

5

Fig. 1 viser aminosyresekvensen for de omhandlede modificerede  $\beta_2$ -mikroglobuliner i sammenligning med sekvensen for  $\beta_2$ m,

Fig. 2 viser krydset radioimmunelektroforese (CRIE) og  
10 krydset immunelektroforese (CIE) analyser af humant serum og humant serum tilsat  $\beta_2$ m,

Fig. 3 viser resultaterne fra et  $\beta_2$ m enzymbundet immunsorbent assay (ELISA) af fraktioner fra den kromatografiske elue-  
15 ring af  $\beta_2$ m og m $\beta_2$ m,

Fig. 4 viser CIE analyser af fraktioner fra de to toppe i Fig. 3B, og

20 Fig. 5 viser relationen mellem cytotoxisk aktivitet af 25 blandede lymfocytkulturer (MLC) og tilsat m $\beta_2$ m.

Modificeret  $\beta_2$ -mikroglobulin er defineret som den fraktion af  $\beta_2$ m, der har en relativ mobilitet på 2,0 i sammen-  
25 ligning 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 lunge-  
30 cancer 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.

35 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.

Det omhandlede produkt  $m\beta_2m$  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  $\beta_2m$  eller  $m\beta_2m$  som defineret angivet i Fig. 4 B, s. 630, i Plesner: Allergy 35 (1980) s. 627-637.

Det omhandlede  $m\beta_2m$  kan også opnås ved enhver anden kombination af velkendte metoder, hvorved molekyler fraktioneres efter deres størrelse og isoelektriske punkt.

$m\beta_2m$  ifølge opfindelsen have 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  $m\beta_2m$  et pI på 5,3 ved analytisk IEF.

Det isolerede  $m\beta_2m$  underkastedes aminosyresekventering og fandtes at bestå af en blanding af peptider med den almene formel I



hvor  $R_1$  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  
5 (58) i det native  $\beta_2m$  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 78 (1981)  
10 s. 6613-6617, som også angiver Asn i position 42.

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

Aminosyresekvensen for Y- $R_3$ -Cys- $R_4$ -kæden (B-kæden) er  
20 identisk med resterne (57) 59 - 99 i den i (1) offentliggjorte sekvens for nativ  $\beta_2m$ , idet Y overvejende var Asp.

I et overraskende aspekt ved opfindelsen viste det sig, at rensed  $m\beta_2m$  forøgede den cytotoxiske aktivitet i blandede  
25 lymphocytkulturer (MLC) samt stimulerede produktionen af lymphokinen interleukin-2 (IL-2). Vekselvirkningen af  $m\beta_2m$  med det store histokompatibilitetskompleks (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  
30 aktivitet såsom interleukin-1 (IL-1) og en forøget expression af receptorer for IL-2 og forhøjet endogen produktion af denne lymphokin. Denne biologiske aktivitet ved det omhandlede  $m\beta_2m$  angiver en farmaceutisk anvendelighed af  $m\beta_2m$  som biologisk responsmodificerende middel, hvor den farmakologiske virkning vil  
35 være relateret til immunsystemets tilstand. Farmakologiske virkninger af  $m\beta_2m$  er relateret til virkningen på membranniveauet på grund af vekselvirkning med MHC og er blandt andet relateret til den specifikke stimulatoriske virkning på IL-2 produktion.

En stimulatorisk virkning på IL-2 produktion forstærker en række immunologiske aktiviteter, såsom stimulering, suppression o.s.v. afhængigt af immunsystemets tilstand ved indgivningen af  $5 \text{ m}\beta_2\text{m}$ . Et særligt vigtigt aspekt ved stimuleringen af IL-2 produktion med  $\text{m}\beta_2\text{m}$  vil være forstærkningen af lymphokinaktiveret dræbning (LAK) formidlet af naturlige dræberceller (NK), som er kendte for at stimulere tumorregressioner.

10           Opfindelsen belyses nærmere i de følgende eksempler.

15 Eksempel 1

Isolation og rensning af  $\text{m}\beta_2\text{m}$

a) Materialer og metoder:

20

Materialer

Sephadex® G-75 og Polybuffer Exchanger 94 leveredes fra Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sverige. Acrylamid, methylen-  
25 bis-acrylamid og ammoniumpersulfat leveredes fra Serva, Heidelberg, Vesttyskland. Ammediol og natrium dodecylsulfat leveredes fra Merck, Darmstadt, Vesttyskland.

Udgangsmateriale

30

Serumprøver fra to patienter med histologisk verificeret småcellet anaplastisk lungecancer (17) isoleredes indenfor 6 timer efter udtagning af blodprøverne og holdtes frosne ved  $-20^\circ\text{C}$  indtil anvendelse.

35

Urinær  $\beta_2$ m

Urinprøver opsamlet fra uremiske patienter anvendtes til isolering af urinært  $\beta_2$ m. Proteiner udfældedes med 90% - 100% ammoniumsulfat ved 5000 G i en time. Det udfældede stof solubiliseredes derefter i isotonisk saltopløsning. Rensningsprocedurerne var derefter identiske med, hvad der er beskrevet for serum nedenfor.

 $^{125}$ I mærkning af protein A

10

5 mg protein A (Pharmacia Fine Chemicals) rekonstitueredes i isotonisk saltopløsning til en slutkoncentration på 1,25 g/l. Ca. 12,5  $\mu$ l mærkedes med 2 mCi  $^{125}$ I (IM 5681, Amersham, Buckinghamshire, England) efter Bolton-Hunter metoden (ref.). Mærket protein A afsaltedes derefter på en PD-10 søjle (Pharmacia Fine Chemicals) og fortyndedes derpå i 2 liter phosphatpufferet saltopløsning (PBS) pH 7,4 indeholdende okse-serumalbumin (BSA) (1 g/l) og  $\text{NaN}_3$  (5 mM) (Merck). Det anvendtes derefter i et tidsrum på en måned til inkubering af immuno-elektroforeseplader.

20

Krydset immuno-elektroforese (CIE)

Gelen var 1% (w/v) HSA agarose (Litex, København, Danmark) i 7,3 mM Tris, 28 mM barbital puffer (pH 8,6) indeholdende 2 mM  $\text{NaN}_3$ . Gelbundet film 70 mm x 75 mm x 0,2 mm (Marine Colloids, Rockland, Maine, U.S.A.) anvendtes som underlag. Til elektroforese i den første dimension påførtes 20  $\mu$ l eller 40  $\mu$ l og elektroforeredes ved 10 V/cm indtil en hæmoglobinmarkør havde vandret 2,5 cm (ca. 75 minutter). Elektroforese i den anden dimension overfor kanin anti-human  $\beta_2$ m (Dakopatts, København, Danmark) (1  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>) udførtes ved 2 V/cm i mindst 16 timer. Pladen pressedes derefter og vaskedes to gange i isotonisk saltopløsning efterfulgt af tørring og farvning med Commassie Brilliant Blue R-2500 (Sigma, St. Louis, U.S.A.).

35

Krydset radioimmunoelktroforese (CRIE)

Til krydset radioimmunoelktroforese inkuberedes den samme plade som ovenfor natten over med  $^{125}\text{I}$  mærket protein A opløsning. Ikke-specifikt bundet radioaktivitet fjernedes ved vask af pladerne i isotonisk saltopløsning i 6 timer, og i destilleret vand natten over. Efter tørring visualiseredes det radioaktive udfældede stof ved autoradiografi på Kodak XS-1 film. Exponeringstiden var normalt 2 - 16 timer (18). CRIE anvendtes til at bedømme den  $\beta_2\text{m}$  modificerende aktivitet, eftersom mængden af  $\text{m}\beta_2\text{m}$  anses for at være proportional med arealet under  $\beta_2\text{m}$  præcipitatet i det  $\alpha$ -elktroforetiske område. Arealet af de to toppe målt med et semiautomatisk planimeter, som beskrevet af Weeke (19). Andelen udtryktes på en skala fra 0 - 1 arbitrær enhed (A.U.). (Arealet der er afgrænset af  $\beta_2\text{m}$  præcipitatet i  $\alpha$ -området divideret med det totale areal af både  $\beta_2\text{m}$  toppen og  $\text{m}\beta_2\text{m}$  toppen ( $\alpha + \beta$  fraktionen)). Standardafvigelsen var 0,03 A.U.

Enzyrbundet immunosorbent assay af  $\beta_2\text{m}$ 

20

$\beta_2\text{m}$  indholdet af forskellige fraktioner blev anslået ved en modifikation af ELISA metoden ifølge (20).

Anvendte antisera: Kanin anti-human  $\beta_2\text{m}$  antistof (lot 095) og peroxidasekonjugeret kanin anti-human  $\beta_2\text{m}$  antistof (lot 100) leveredes begge fra DAKO-Immunoglobulins A/S, København, Danmark.

Reagenser: Reagens A (overtrækspuffer): PBS (0,010 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ ; 0,145 M NaCl, pH 7,2 + 0,2). Reagens B (vaske- og fortyndingspuffer): PBS; 0,1% Tween 20 (v/v) (Merck), 0,5 M NaCl. Reagens C (farvereagens): 8 mg 1,2-phenylendiamin dihydrochlorid (lot 095 (DAKO)), 12 ml 0,1 M citronsyrefosfatpuffer, pH 5,0 + 0,2, 5  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

35

Sera: Standard sera fremstilledes ved 300 gange fortynding af standarderne i Pharmacia  $\beta_2$ m RIA kit Katalog Nr. 10-6408-01, lot 8577 med reagens B til opnåelse af et arbejdsområde på 1,33 l 53,33  $\mu$ g/l. Kontrolsera var  $\beta_2$ m højt niveau og lavt niveau begge 5 leveret fra Pharmacia.

$\beta_2$ m ELISA: Brøndene i en polystyren mikrotiterplade (kode 239454, Nunc, København) blev overtrukket med  $\beta_2$ m antistof ved tilsætning af 100  $\mu$ l  $\beta_2$ m antistof (2,9 g/l) fortyndet 1:1000 med 10 reagens A i hver brønd. Efter 24 timers inkubering ved stuetemperatur tømtes pladen og vaskedes tre gange med reagens B. Standard- og undersøgelsesprøver fortyndedes med reagens B, 100  $\mu$ l fortynding pipeteredes i de sensitiviserede brønde. Hver bestemmelse udførtes in duplo. Inkuberingen afsluttedes efter 1 time ved at tømme brønd- 15 ene efterfulgt af tre gange vask med reagens B. Det peroxidasmærkede  $\beta_2$ m antistof (1,3 g/l) fortyndedes 1:1000 med reagens B, og 100  $\mu$ l af fortyndingen afpipetteredes i hver brønd og inkuberedes i 0,5 time i mørke ved stuetemperatur. Derefter tømtes pladen og vaskedes tre gange med reagens B efterfulgt af tilsætning af 100  $\mu$ l 20 farvereagens C i hver brønd og inkubering i nøjagtig 15 minutter, hvorefter enzymreaktionen standsedes ved tilsætning af 150  $\mu$ l 1 M svovlsyre i hver brønd. Ekstinktionen i mikrotiterpladens brønde bestemtes ved aflæsning med en ELISA læser SLT 210 (Salzburg, Østrig) ved 492 nm bølgelængde. Alle analysens trin udførtes ved 25 stuetemperatur. Der anvendtes en 8-kanals pipette (Titertek, Teknunc) til hurtig tilsætning af reagenser til brøndene.

Standardkurven konstrueredes ved at indføre middelværdien for hver dobbelte standardbestemmelse som funktion af koncentrationen på semi-logaritmisk papir. Variationskoefficienten for dobbeltbestemmelser var 9%.

#### SDS-PAGE

35 SDS-PAGE udførtes i 2,0 mm tykke 13 x 16,5 cm pladegeler. Gelen og puffersystemet var, som anført af Wycoff (22) og Bury (23), under anvendelse af en lineær gradientgel ( $T = 5,2\% - 15,3\%$ ,

C = 2,6% (bis)). Stackinggelen var T = 4,2%, C = 2,61% (bis). De analyserede prøver opvarmedes i 5 minutter ved 95°C i 1% SDS. Til alkylering af frie thiolgrupper i ikke-reducerede prøver tilsattes jodacetamid (Sigma) til en slutkoncentration på 110 mM. I tilfælde med disulfidbindingsreduktion tilsattes dithiothreitol (Sigma) til en slutkoncentration på 55 mM. Umiddelbart efter opvarmning gennemførtes tilsætning af jodacetamid til en slutkoncentration på 220 mM i ikke-reduceret og 110 mM i reduceret form.

10 Der anvendtes de følgende MW standarder fra Pharmacia Fine Chemicals: Phosphorylase b(94.000), albumin (67.000), ovalbumin (43.000), karbonanhydrase (30.000), trypsinhæmmer (20.100) og  $\alpha$ -lactalalbumin (14.400). Bromphenolblue (Riedel de Hauen, Seelze, Vesttyskland) anvendtes som frontmarkør. Gelerne farvedes med  
15 Coomassie Brilliant Blue R-250 efter Fairbanks et al. (24).

#### Analytisk IEF

Analytisk IEF udførtes på Ampholine® PAG plader (LKB, 20 Bromma, Sverige) ved 25 w/time. Efter IEF fikseredes gelen i 0,14 M sulfosalicylsyre og 0,7 M trichloredikesyre i destilleret vand. Gelen farvedes derefter i Coomassie Brilliant Blue R-250 solubilisert i affarvningsopløsning i 10 minutter ved 60°C. Affarvning til fjernelse af overskud af farvestof udførtes i 500 ml 25% v/v  
25 ethanol blandet med 160 ml 8% v/v eddikesyre. Til pI bestemmelse var de følgende markører inkluderet: Trypsinogen (pI 9,30), lentil lectin-basisk bånd (pI 8,65), lentil lectin-mellem (pI 8,45), lentil lectin-sur (pI 8,15), myoglobinbasisk bånd (pI 7,35), myoglobin-surt bånd (6,85), human karbonhydrase B (pI 6,55), oksekarbon-  
30 hydrase B (pI 6,85),  $\beta$ -lactoglobulin A (pI 5,20) sojabønnetrypsinhæmmer (pI 4,55), amyloglucosidase (pI 3,50). Bredt kalibreringssæt pI 3,5 - 10 (Pharmacia Fine Chemicals).

### Sekvensanalyse

Edman nedbrydninger udførtes med en gasfasesekvenser (Applied Biosystems model 470A) som beskrevet i (25). Phenyliso-  
5 thiocyanataminosyrerne identificeredes og kvantificeredes ved mod-  
fase HPLC på en IBM cyanosøjle.

Ved S-aminoetyleret peptid mærkedes cysteingrupperne med  $^{14}\text{C}$  under aminoetyleringen og cysteingrupper i disse peptider  
10 bestemtes ved radioaktiv tælling fra 20% af hver phenylthiohydantoinaminosyre (PTH-a.a.) gruppe.

### Aminosyreanalyse

15 Ca. 5 nmol protein hydrolyseredes i 100  $\mu\text{l}$  6 N HCl ved 110°C i 24 timer. Aminosyreanalysen udførtes på en Beckmann model 121 aminosyreanalysator. Der foretoges ingen korrektion for  
destruktion af Trp, Ser, Thr og Cys.

### 20 C-Terminalbestemmelse

Ca. 20 nmol S-aminoetyleret A-kæde opløstes i 650  $\mu\text{l}$  50 mM pyridin-acetatpuffer (pH 6,15). 20  $\mu\text{l}$  norleucin standard (6,5 nmol/ $\mu\text{l}$  vand), og 30  $\mu\text{l}$  carboxypeptidase Y (Boehringer, Mannheim, Vesttyskland) opløst i vand (1,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) tilsattes. Inkuberingen  
25 udførtes ved 37°C, og 100  $\mu\text{l}$  af nedbrydningsblandingen fjernedes ved tidspunkterne 0, 10, 30 og 120 minutter. Omsætningen standsedes ved tilsætning af 15  $\mu\text{l}$  eddikesyre. Efter 120 minutters nedbrydning tilsattes 5  $\mu\text{l}$  carboxypeptidase B opløsning i vand (Boehringer,  
30 Mannheim, Vesttyskland) (0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) og prøver på 100  $\mu\text{l}$  fjernedes til tidspunkterne 125 minutter, 180 minutter og 22 timer, og enzymreaktionen standsedes ved tilsætning af 15  $\mu\text{l}$  eddikesyre. Prøverne lyophiliseredes og underkastedes aminosyreanalyse. Der udførtes  
korrektioner for prøverumfang (intern standard) og for frit amino-  
35 syreindhold i pufferen (prøve ved 0 minutter).

Reduktion, alkylering og S-aminoethylering

100 nmol m $\beta_2$ m reduceredes natten over ved stuetemperatur med 5 mM dithiothreitol i 0,5 M Tris - HCl puffer pH 8,1 indehol-  
5 dende 6 M guanidinhydrochlorid (Sigma) og 0,005 M ethylendiamino-  
etetraeddikesyre (EDTA) (Merck). Efter reduktion tilsattes 50  $\mu$ Ci  
jod(2-<sup>14</sup>C)eddikesyre (Amersham, CFA 269, specifik aktivitet på 56  
mCi/mmol) og alkyleringen fortsattes i 30 minutter i mørke, hvor-  
10 efter kold jodeddikesyre tilsattes til 10 mmol og alkylering fort-  
sattes i mørke indtil A- og B kæderne var adskilt på HPLC på den  
samme dag.

Reaktionsblandingen fraktioneredes ved præparativ HPLC på  
en Waters Nova-pak® 5  $\mu$ , C-18 søjle (4,6 mm x 150 mm). A-pufferen  
15 var 0,1% (v/v) trifluoreddikesyre i H<sub>2</sub>O og B-pufferen var 0,07%  
(v/v) trifluoreddikesyre i acetonitril. Søjlen bragtes i ligevægt  
med 95% A / 5% B, og 200  $\mu$ l prøve injiceredes. Efter prøveinjektio-  
nen elueredes søjlen med en strømningshastighed på 1 ml/minut med  
95% A / 5% B i 2 minutter og derefter med en lineær gradient på 1%  
20 B-puffer/minut. Absorbansen ved 280 nm registreredes og fraktioner  
samledes. Peptidmaterialet isoleredes ved vakuum-centrifugering  
(Savant vacuum centrifuge) og underkastedes sekvensanalyse.

b) Procedure

25

Inkubering

Ca. 50 ml serum isoleredes fra to patienter med småcellet  
lungecancer, og 3,62 mg rensset urinært  $\beta_2$ m tilsattes. Serumet  
30 inkuberedes derefter i 6 dage ved 20°C.

For at overvåge og identificere m $\beta_2$ m under rensningspro-  
cedurerne anvendtes CIE på prøver udtaget fra forskellige fraktio-  
ner under proceduren. Til sammenligning viser fig. 2 CRIE (fig. 2 a  
35 og b) og CIE (fig. 2 c og d) analyser af henholdsvis serum og serum  
med tilsat  $\beta_2$ m, inden inkubering og efter 3 dages inkubering ved  
20°C.

Af fig. 2 fremgår det, at fremkomsten af  $m\beta_2m$  er et resultat af inkuberingen, og det er også tydeligt, at tilsætningen af nativt  $\beta_2m$  forøger udbyttet af  $m\beta_2m$  meget.

#### 5 G-75 Sephadex® gelfiltrering

Efter inkubering anbragtes serumprøven (50 ml) på en søjle (100 x 5 cm) pakket med Sephadex® G-75 og bragt i ligevægt med 0,025 M imidazol/HCl puffer pH 7,4. Eluering udførtes med den samme 10 puffer med en strømningshastighed på 40 ml/time. Fraktioner på 10 ml indsamledes og analyseredes med  $\beta_2m$  ELISA. Resultaterne heraf er anført i fig. 3A.

#### Chromatofocusering

15

Fraktioner indeholdende  $\beta_2m$  fra G-75 søjlen samledes og anbragtes på en søjle (0,9 x 70 cm) pakket med Polybuffer Exchanger 94 (Pharmacia Fine Chemicals) og bragt i ligevægt med imidazol/HCl puffer pH 7,4.  $\beta_2m$  elueredes med polypuffer 74 fortyndet 1:8 i 20 destilleret vand og justeret til pH 4,0 med HCl. pH gradienten overvågedes ved pH målinger i hver fraktion efter eluering. Fraktioner på 5 ml indsamledes og analyseredes i et  $\beta_2m$  ELISA, hvis resultater er vist i fig. 3B. Fraktioner svarende til hver af de i fig. 3B viste toppe samledes og analyseredes ved CIE, hvis resultat 25 er vist i fig. 4. Nativt  $\beta_2m$  elueredes ved pI 5,7 og  $m\beta_2m$  ved pI 5,3. Renset  $m\beta_2m$  opnåedes ved at samle de fraktioner, der svarer til den anden top i fig. 3B.

#### Fjernelse af forureninger og endelig rensning

30

For at fjerne forureninger og ammoniumsulfat fra produktet udfældedes de samlede  $m\beta_2m$ -holdige fraktioner med 90 - 100% ammoniumsulfat ved 5000 G i en time, hvorefter det udfældede stof solubiliseredes i isotonisk saltopløsning og anbragtes på en søjle 35 pakket med Sephadex® G-25 og bragt i ligevægt med 1M eddikesyre. Eluering udførtes med samme puffer, og  $m\beta_2m$ -holdige fraktioner samledes.

Det således opnåede produkt analyseredes ved CIE og fandtes at være  $m\beta_2m$  som defineret ovenfor.

#### Aminosyresekvens

5

Aminosyresekvensen for  $m\beta_2m$  ifølge opfindelsen bestemtes efter de ovenfor angivne metoder.

Resultaterne af den N-terminale sekvensanalyse er angivet 10 i Tabel 1 nedenfor.

Tabel 1

N-Terminale aminosyresekvenser i de to kæder af m $\beta$ <sub>2</sub>m

| 5  | Cyklus<br>Nr. | PTH-a.a. | Udbytte<br>(pmol) | PTH-a.a. | Udbytte<br>(pmol) |
|----|---------------|----------|-------------------|----------|-------------------|
|    | 1             | Ile      | 2022              | Asp      | 654               |
|    | 2             | Gln      | 1494              | Trp      | 883               |
| 10 | 3             | Arg      | 500               | Ser      | 190               |
|    | 4             | Thr      | 474               | Phe      | 1845              |
|    | 5             | Pro      | 1173              | Tyr      | 1293              |
|    | 6             | Lys      | 1091              | Leu      | 1572              |
|    | 7             | Ile      | 1383              | Leu      | 1905              |
| 15 | 8             | Gln      | 1361              | Tyr      | 1213              |
|    | 9             | Val      | 1415              | Tyr      | 1305              |
|    | 10            | Tyr      | 1472              | Thr      | 436               |
|    | 11            | Ser      | 73                | Glu      | 596               |
|    | 12            | Arg      | 223               | Phe      | 1070              |
| 20 | 13            | His      | 206               | Thr      | 196               |
|    | 14            | Pro*     | (636)             | Pro*     | (636)             |
|    | 15            | Ala      | 935               | Thr      | 221               |
|    | 16            | Glu**    | (387)             | Glu**    | (387)             |
|    | 17            | Asn      | 691               | Lys      | 456               |
| 25 | 18            | Gly      | 503               | Asp      | 307               |
|    | 19            | Lys      | 536               | Glu      | 365               |
|    | 20            | Ser      | 61                | Tyr      | 487               |
|    | 21            | Asn      | 559               | Ala      | 552               |
|    | 22            | Phe      | 506               | (Cys)    | -                 |
| 30 | 23            | Leu      | 578               | Arg      | 185               |
|    | 24            | Asn      | 318               | Val      | 453               |
|    | 25            | (Cys)    | -                 | Asn      | 382               |
|    | 26            | Tyr      | 379               | His      | 74                |
| 35 | 27            | Val***   | (351)             | Val***   | (351)             |

Gennemsnitligt repetitivt udbytte: 92,2%

\*) Pro er til stede i begge kæder i cyklus nr. 14

\*\*) Glu er til stede i begge kæder i cyklus nr. 16

\*\*\*) Val er til stede i begge kæder i cyklus nr. 27

40

Som angivet af disse resultater, frigøres der to PTH-a.a.-grupper i tilnærmelsesvis ækvimolær mængde ved hver nedbrydningscyklus, hvilket viser at molekylet består af to kæder.

Aminosyresammensætning

Aminosyresammensætningen bestemtes som angivet ovenfor, og resultaterne er tabuleret for  $m\beta_2m$  og  $\beta_2m$  nedenfor.

5

Tabel 2

Aminosyresammensætning af modificeret og nativt  $\beta_2$ -mikroglobulin

| 10 | Aminosyre | Aminosyrerest pr. molekyle |                   |
|----|-----------|----------------------------|-------------------|
|    |           | $m\beta_2m$                | Nativt $\beta_2m$ |
|    | Asx*      | 11,3                       | 12                |
|    | Thr       | 5,6                        | 5                 |
| 15 | Ser       | 8,5                        | 9                 |
|    | Glx*      | 11,8                       | 11                |
|    | Pro       | 6,4                        | 5                 |
|    | Gly       | 5,4                        | 3                 |
|    | Ala       | 3,9                        | 2                 |
| 20 | Cys 1/2   | 1,7                        | 2                 |
|    | Val*      | 7,0                        | 7                 |
|    | Met*      | 1,1                        | 1                 |
|    | Ile       | 4,3                        | 5                 |
|    | Leu*      | 7,6                        | 7                 |
| 25 | Tyr       | 5,3                        | 6                 |
|    | Phe       | 4,6                        | 5                 |
|    | Lys*      | 7,0                        | 8                 |
|    | His       | 3,7                        | 4                 |
|    | Arg*      | 5,3                        | 5                 |
| 30 | Trp       | n.d.                       | 2                 |

n.d. = ikke bestemt

\*) aminosyre anvendt til normalisering

35

Grundet urenheder i proteinpræparatet, er det ikke muligt at fastlægge den nøjagtige aminosyresammensætning af  $m\beta_2m$  ved analysen, men af Tabel 2 fremgår det, at aminosyresammensætningen af  $m\beta_2m$  ligger tæt ved aminosyresammensætningen for nativ  $\beta_2m$ .

40

R<sub>1</sub>-Cys-R<sub>2</sub>-X-kæde (A-kæde)

R<sub>1</sub>-Cys-R<sub>2</sub>-X-kæden i m $\beta$ <sub>2</sub>m isoleredes ved modfase HPLC af det reducerede og S-aminoethylerede protein. Ved sekvenbestemmelse af dette peptid kunne aminosyregrupperne nr. 1 - 56 bestemmes. Sekvensbestemmelsens resultater er tabuleret nedenfor:

Tabel 310 Aminosyresekvens for den S-aminoethylerede A-kæde i m $\beta$ <sub>2</sub>m

|    | Cyklus |          |                   | Cyklus |          |                   |
|----|--------|----------|-------------------|--------|----------|-------------------|
|    | Nr.    | PTH-A.A. | Udbytte<br>(pmol) | Nr.    | PTH-A.A. | Udbytte<br>(pmol) |
| 15 |        |          |                   |        |          |                   |
|    | 1      | Ile      | 7789              | 31     | His      | 422               |
|    | 2      | Gln      | 2656              | 32     | Pro      | 671               |
|    | 3      | Arg      | 1024              | 33     | Ser      | 106               |
|    | 4      | Thr      | 1895              | 34     | Asp      | 457               |
| 20 | 5      | Pro      | 3500              | 35     | Ile      | 566               |
|    | 6      | Lys      | 7625              | 36     | Glu      | 373               |
|    | 7      | Ile      | 4655              | 37     | Val      | 767               |
|    | 8      | Gln      | 3470              | 38     | Asp      | 276               |
|    | 9      | Val      | 4950              | 39     | Leu      | 721               |
| 25 | 10     | Tyr      | 4006              | 40     | Leu      | 810               |
|    | 11     | Ser      | 495               | 41     | Lys      | 352               |
|    | 12     | Arg      | 1119              | 42     | Asn      | 345               |
|    | 13     | His      | 978               | 43     | Gly      | 239               |
|    | 14     | Pro      | 2295              | 44     | Glu      | 136               |
| 30 | 15     | Ala      | 3650              | 45     | Arg      | 187               |
|    | 16     | Glu      | 1675              | 46     | Ile      | 328               |
|    | 17     | Asn      | 1475              | 47     | Glu      | 154               |
|    | 18     | Gly      | 1749              | 48     | Lys      | 203               |
|    | 19     | Lys      | 5410              | 49     | Val      | 213               |
| 35 | 20     | Ser      | 166               | 50     | Glu      | 148               |
|    | 21     | Asn      | 1542              | 51     | His      | 58                |
|    | 22     | Phe      | 2214              | 52     | Ser      | 17                |
|    | 23     | Leu      | 2239              | 53     | Asp      | 92                |
|    | 24     | Asn      | 1200              | 54     | Leu      | 166               |
| 40 | 25     | -        | -                 | 55     | Ser      | 8                 |
|    | 26     | Tyr      | 1427              | 56     | Phe      | 193               |
|    | 27     | Val      | 1660              | 57     | -        | -                 |
|    | 28     | Ser      | 173               | 58     | -        | -                 |
|    | 29     | Gly      | 783               | 59     | -        | -                 |
| 45 | 30     | Phe      | 1359              |        |          |                   |

Gennemsnitligt repetitivt udbytte: 96,9% (a.a. 1 - 20), 90,9% (a.a. 20 - 56)

Fastlæggelsen af cysteingrouppen i position 25 var baseret på radioaktiv tælling af en portion af hver PTH-a.a. gruppe.

På denne kæde udførtes C-terminal aminosyresekvensbestemmelse ved carboxypeptidase nedbrydning af den S-aminoethylerede kæde. Resultaterne af denne analyse er vist i den følgende Tabel 4.

Tabel 4

10 C-terminalbestemmelse af den S-aminoethylerede A-kæde i  $m\beta_2m$  med carboxypeptidase Y og B

| A.a.   | TID     |         |          |          |          |      |
|--------|---------|---------|----------|----------|----------|------|
|        | 10 min. | 30 min. | 120 min. | 125 min. | 180 min. | 22 t |
| 15 Asp | 0,7     | 1,1     | 1,5      | 1,6      | 1,7      | 3,5  |
| Thr    | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 1,8  |
| Ser    | 2,3     | 2,7     | 3,2      | 3,2      | 3,6      | 6,9  |
| 20 Glu | 0,5     | 1,0     | 1,5      | 1,6      | 2,1      | 5,6  |
| Pro    | 0       | 0       | 0        | 0        | 0,9      | 1,9  |
| Gly    | 0,1     | 0,3     | 0,4      | 0,4      | 0,6      | 2,4  |
| Ala    | 0       | 0       | 0        | 0        | 0,2      | 1,1  |
| Val    | 0       | 0,5     | 0,8      | 0,9      | 1,2      | 4,1  |
| 25 Ile | 0,2     | 0,4     | 0,6      | 0,6      | 0,8      | 3,9  |
| Leu    | 2,7     | 3,5     | 3,6      | 3,6      | 3,6      | 4,9  |
| Tyr    | 0       | 0,1     | 0,3      | 0,3      | 0,4      | 1,9  |
| Phe    | 1,5     | 2,5     | 2,6      | 2,5      | 2,7      | 3,2  |
| Lys    | 0,3     | 0,3     | 0,6      | 0,7      | 1,0      | 2,8  |
| 30 His | 0,3     | 0,5     | 0,7      | 0,8      | 1,3      | 2,6  |
| Arg    | 0       | 0,2     | 0,3      | 0,3      | 0,5      | 2,0  |

Af denne tabel kan det udledes, at i produktet ifølge opfindelsen er X i formel I overvejende Phe, i mindre grad Phe-Ser, 35 og kun mindre mængder, hvor X er Phe-Ser-Lys.

Y-R<sub>3</sub>-Cys-R<sub>4</sub>-kæde (B-kæde)

Resultaterne af sekvensanalysen af den S-aminoethylerede Y-R<sub>3</sub>-Cys-R<sub>4</sub>-kæde er vist i Tabel 5 nedenfor:

5

Tabel 5

Aminosyresekvens for den S-Aminoethylerede B-kæde i mβ<sub>2</sub>m

|    | Cyklus<br>Nr. | PTH-A.A. | Udbytte<br>(pmol) |
|----|---------------|----------|-------------------|
| 10 | 1             | Asp      | 2979              |
|    | 2             | Trp      | 3770              |
|    | 3             | Ser      | 406               |
|    | 4             | Phe      | 3941              |
| 15 | 5             | Tyr      | 3634              |
|    | 6             | Leu      | 3562              |
|    | 7             | Leu      | 3946              |
|    | 8             | Tyr      | 3036              |
|    | 9             | Tyr      | 3315              |
| 20 | 10            | Thr      | 512               |
|    | 11            | Glu      | 2128              |
|    | 12            | Phe      | 2581              |
|    | 13            | Thr      | 448               |
|    | 14            | Pro      | 1353              |
| 25 | 15            | Thr      | 292               |
|    | 16            | Glu      | 1068              |
|    | 17            | Lys      | 1302              |
|    | 18            | Asp      | 690               |
|    | 19            | Glu      | 669               |
| 30 | 20            | Tyr      | 1170              |
|    | 21            | Ala      | 1005              |
|    | 22            | -        | -                 |
|    | 23            | Arg      | 350               |
|    | 24            | Val      | 1022              |
| 35 | 25            | Asn      | 586               |
|    | 26            | His      | 304               |
|    | 27            | Val      | 724               |
|    | 28            | Thr      | 94                |
|    | 29            | Leu      | 400               |
| 40 | 30            | Ser      | 37                |
|    | 31            | Gln      | 207               |
|    | 32            | Pro      | 261               |
|    | 33            | Lys      | 307               |
|    | 34            | Ile      | 244               |
| 45 | 35            | Val      | 281               |
|    | 36            | Lys      | 280               |
|    | 37            | Trp      | 153               |
|    | 38            | Asp      | 112               |
|    | 39            | Arg      | 141               |
| 50 | 40            | Asp      | 167               |
|    | 41            | Met      | 35                |

Gennemsnitligt repetitivt udbytte: 87,4%.

Som ovenfor er fastlæggelsen af cysteingrouppen i position 22 baseret på radioaktiv tælling af en portion af hver PTH-a.a. gruppe. Sekvensen ovenfor er identisk med sekvensen af grupperne 5 59 - 99 i den offentliggjorte sekvens af  $\beta_2m$ .

## Eksempel 2

### $M\beta_2m$ som biologisk responsmodificerende middel

10

Aktiviteten af  $m\beta_2m$  som et biologisk respons-modificerende middel bedømtes ved forstærkningen af envejs allogene blandede lymphocytkulturer (MLC).

### 15 Blandede lymphocytreaktioner

Der anvendtes tre forskellige protokoller.

1. Mikrokulturmetoden (Claesson, M.H. og Miller, R.G. 20 J.Immunol. 134 (1985) s. 684. Kulturer udførtes i replikater på fire til seks i 96-brønds koniske mikrotiterplader (NUNC, Roskilde, Danmark). Responderceller,  $2 - 5 \times 10^5$ /kultur, og mitomycinbehandlet stimulatorceller ( $10^6$ /kultur), dyrkedes i et totalt rumfang på 200  $\mu$ l.

25

2. Kulturer udførtes i 12 mm x 75 mm plastrør (Falcon, Oxnard, U.S.A.) med  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  mitomycinbehandlede stimulatorceller pr. ml i rumfang på 1 - 2 ml.

30

3. Kulturer udførtes i 50 ml vævskulturkolber (NUNC) med  $10^6$ /ml henholdsvis responder- og stimulatorceller i rumfang på 5 - 10 ml. Nativt og modificeret  $\beta_2m$  sættes til individuelle MLC ved dyrkningens dag 0 eller i separate undersøgelser ved dyrkningens dag 0 til 4.

35

### Cytotoxicitets-assays

Cytotoxisk aktivitet af MLC kulturerne bestemtes efter 5  
dages dyrkning ved et 4 timers  $^{51}\text{Cr}$ -frigørelsesassay. Targetceller  
5 var  $2 - 5 \times 10^3$   $^{51}\text{Cr}$ -mærkede RBL5 ( $\text{H2}^b$ , P815 ( $\text{H-2}^d$ )) og YAC (NK  
target) tumorcellelinier, og ved nogle undersøgelser Concanavalin A  
inducerede miltcelleblaster fra MLC stimulatorstammen eller en  
ubeslægtet tredje stamme. Targetceller,  $1 - 5 \times 10^6$  i 0,1 ml føtalt  
kalveserum mærkedes med 150  $\mu\text{Ci}$  natrium ( $^{51}\text{Cr}$ ) kromat i 1 - 2 timer  
10 ved  $37^\circ\text{C}$ . Derefter vaskedes cellerne fire gange inden cytotoxici-  
tetsassay. Spontan  $^{51}\text{Cr}$ -frigørelse bestemtes ud fra targetceller,  
der var sat til kulturer, der kun indeholdt mitomycinbehandlet  
stimulatorceller. Total frigørbar  $^{51}\text{Cr}$  bestemtes ud fra eddikesyre-  
behandle targetceller. Procentvis specifik  $^{51}\text{Cr}$ -frigørelse beregne-  
15 des som:  $(\text{Observeret frigørelse} - \text{spontan frigørelse}) / (\text{total}$   
 $\text{frigørelse} - \text{spontan frigørelse}) \times 100$ .

Ved mikrokultur MLC fjernedes 0,1 ml ovenstående væske og  
erstattedes med 0,1 ml  $^{51}\text{Cr}$ -mærkede targetceller. I kulturrørs- og  
20 kulturkolbe MLC systemerne, tilsattes 0,1 ml rumfang i replikater  
på fire 96-brønds V-bundede mikrotiterplader (NUNC) efterfulgt af  
en passende tilsætning  $^{51}\text{Cr}$ -mærkede targetceller i rumfang på 0,1  
ml. I separate undersøgelser rensedes MLC responderceller ved cen-  
trifugering på Lymphopaque® (Pharmacia, Sverige) og titreredes mod  
25 et konstant antal targetceller. Efter fire timers assay fjernedes  
kulturrumfang på 0,1 ml ovenstående væske til gammataelling.

### Interleukin 2 (IL-2) måling

30 IL-2 indholdet målttes in duplo i 2 ml rør MLC kulturer  
fra dyrkningens dag 1 til 4. Ethundrede  $\mu\text{l}$  individuelle kultur-  
supernatanter sættes til tre replikater af en IL-2 afhængig CTL  
linie, 4B3 (Curtis, A.S.G. og Rooney, P., Nature, London, 281  
(1979) s. 222) fra Dr. R.G. Miller, the Ontario Cancer Institute,  
35 Toronto, Canada. 4B3 CTL dyrkedes med  $4 \times 10^3$  celler pr. brønd i  
fladbundede 96-brønds mikrotiterplader (NUNC) i 48 timer efterfulgt

af tilsætning af  $^3\text{H}$ -TdR (0,1  $\mu\text{Ci}$  pr. brønd) i 6 timer. Celler høstede i en Scantron Cell Harvester (Oslo, Norge) og taltes i en Scintillationstæller.

5            Fig. 5 viser, at  $m\beta_2m$  signifikant ( $p = 0,01$ ) forøger dannelsen af cytotoxiske lymphocytter (CTL) når det sættes til MLC ved koncentrationer fra 10 - 1000 nM. Den funktionelle aktivitet af CTL frembragt i  $m\beta_2m$  exponerede MLC var specifik eftersom, der ikke frembragtes nogen cytotoxisk aktivitet overfor en tredje  
10 haplotype targetceller eller naturlige dræberfølsomme targetceller. Endvidere påvirkede  $m\beta_2m$  sat direkte til det cytotoxiske assay ikke MLC frembragt drab ved CTL.

Supernatanterne fra MLC udsat for nativt eller modifiseret  
15  $\beta_2m$  undersøgte for endogen IL-2 produktion fra dyrkningernes dag 1 - 4. Data er anført i Tabel 6.

Tabel 6

IL-2 produktion i MLC exponeret for  $\beta_2m$  og  $m\beta_2m$  (200 nM/ml) og PBS.  
 5 MLC bestod af  $2 \times 10^6$  SJL anti  $2 \times 10^6$  BALB/c i rumfang på 2 ml.  
 IL-2 produktion undersøgtes med en IL-2 afhængig CTL klon, 4B3.

IL-2<sup>a</sup> enheder pr. MLC kulturer

10

| Tilsætning  | 1 <sup>b)</sup> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> |
|-------------|-----------------|----------|----------|----------|
| $m\beta_2m$ | 0               | 14       | 136      | 80       |
| $\beta_2m$  | 2               | 12       | 42       | 104      |
| 15 PBS      | 0               | 16       | 28       | 70       |

a) En IL-2 enhed er defineret som den mængde af IL-2, der fordobler formeringsreaktionen for  $5 \times 10^3$  4B3 CTL i 48 timers kulturer.

20 b) Dage for MLC.

Af Tabel 6 fremgår det klart, at  $m\beta_2m$  stimulerer den tidlige (dag 3) produktion af endogent IL-2 i sammenligning med MLC exponeret for nativt  $\beta_2m$  og PBS. I fjerde dags-MLC-kulture var IL-2  
 25 koncentrationen imidlertid faldende i  $m\beta_2m$  exponerede MLC sandsynligvis på grund af en forøget optagelseshastighed af de formerende CTL på dette tidspunkt i kulturen.  $M\beta_2m$  har ikke i sig selv nogen IL-2 virkning, når det afprøves direkte på den klonede CTL linie 4B3 (Curtis, A.S.G. og Rooney, P., Nature (London) 281 (1979) s.  
 30 281) anvendt til titrering af IL-2 aktivitet.

Litteraturhenvisninger:

1. Cunningham, B.A., Wang, J.L., Berggård, I. & Peterson, P.A.  
5 (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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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,  
25 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.
- 30 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 immunoelectrophore-  
sis. Methods and applications. 1st edn. (Axelsen, N.H., Krøll,  
35 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.  
5 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,  
10 142 - 148.

## PATENTKRAV

1. Modificeret  $\beta_2$ -mikroglobulin, k e n d e t e g n e t ved, at det har den almene formel I:



hvor  $R_1$  er en 24 aminosyregruppe med sekvensen:  
Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr-Ser-Arg-His-Pro-Ala-  
10 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:  
15 -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,

20 -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 højst er 4.

2. Modificeret  $\beta_2$ -mikroglobulin ifølge krav 1, k e n d e -  
25 t e g n e t ved, at -X er -Phe-Ser-Lys, og Y- er Asp-.

3. Modificeret  $\beta_2$ -mikroglobulin ifølge krav 1, k e n d e -  
t e g n e t ved, at -X er -Phe, og Y- er Asp-.

30 4. Modificeret  $\beta_2$ -mikroglobulin ifølge krav 1, k e n d e -  
t e g n e t ved, at -X er -Phe-Ser, og Y- er Asp-.

5. Modificeret  $\beta_2$ -mikroglobulin ifølge krav 1, 2, 3, eller  
4, k e n d e t e g n e t ved, at det er i detekterbart mærket  
35 form, fortrinsvis radiomærket form.

6. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det  
sammen med et eller flere fysiologisk forenelige bæremidler inde-

holder modificeret  $\beta_2$ -mikroglobulin ifølge ethvert af kravene 1 til 5 eventuelt i kombination med  $\beta_2$ -mikroglobulin.

7. Farmaceutisk præparat ifølge krav 5, k e n d e t e g-  
5 n e t ved, at det er et biologisk responsmodificerende middel.

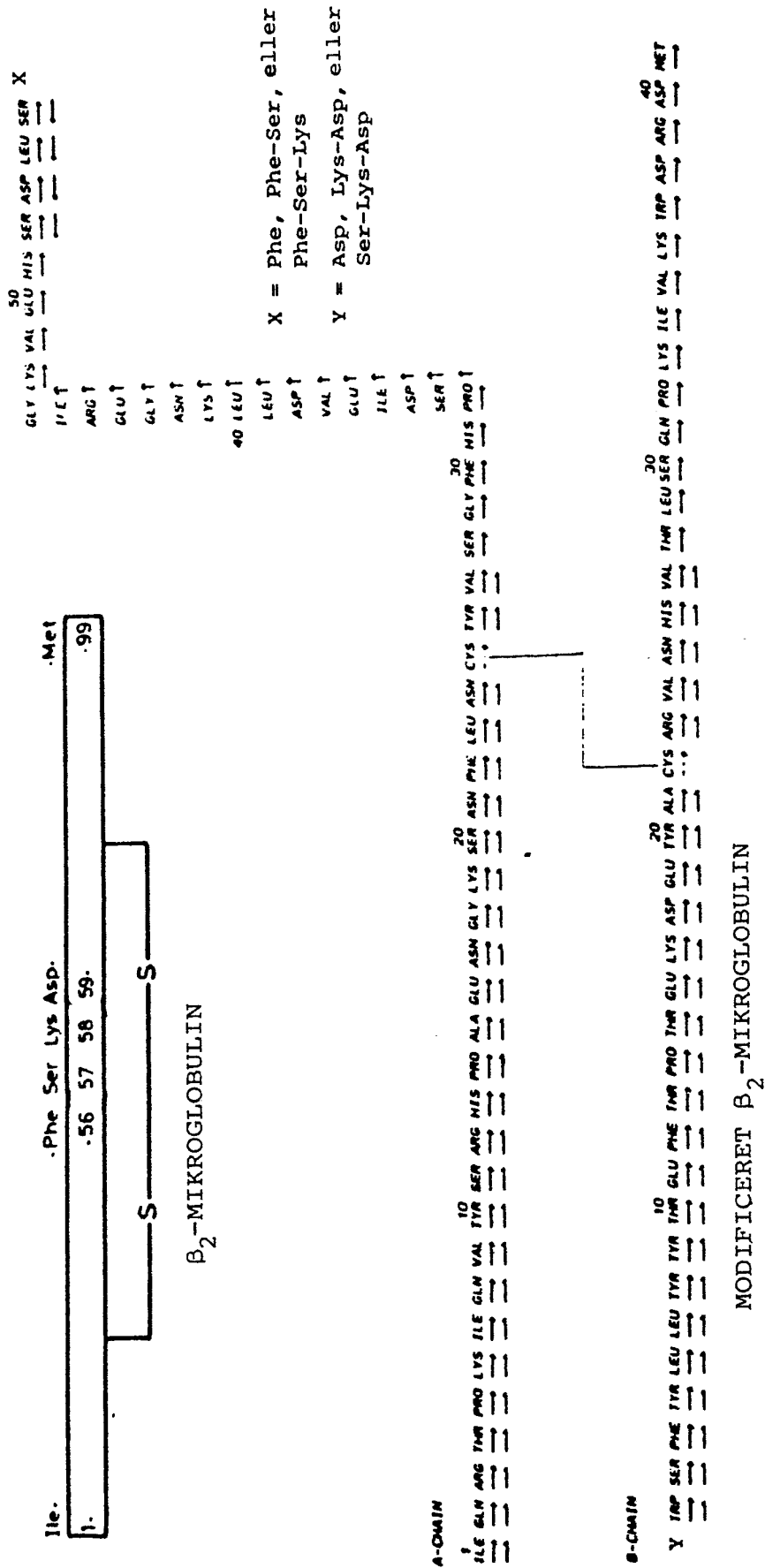


FIG. 1

Serum fra en SLC patient

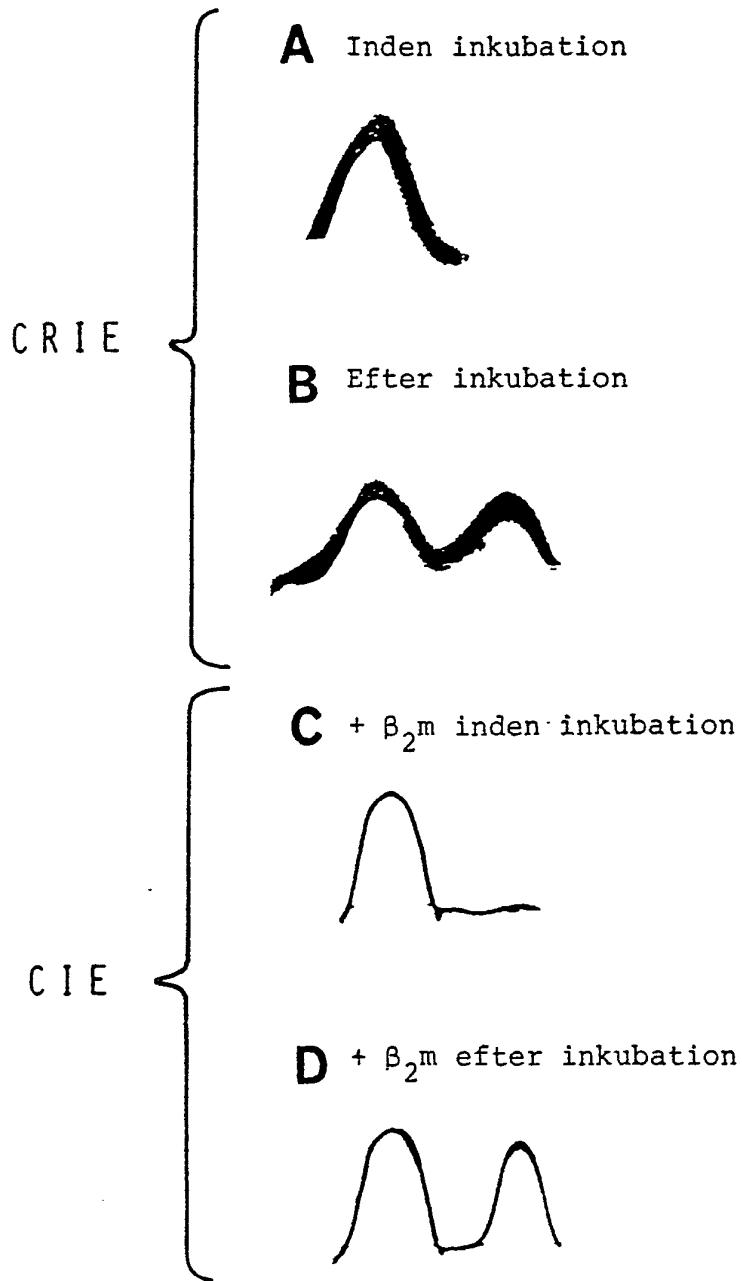


FIG. 2

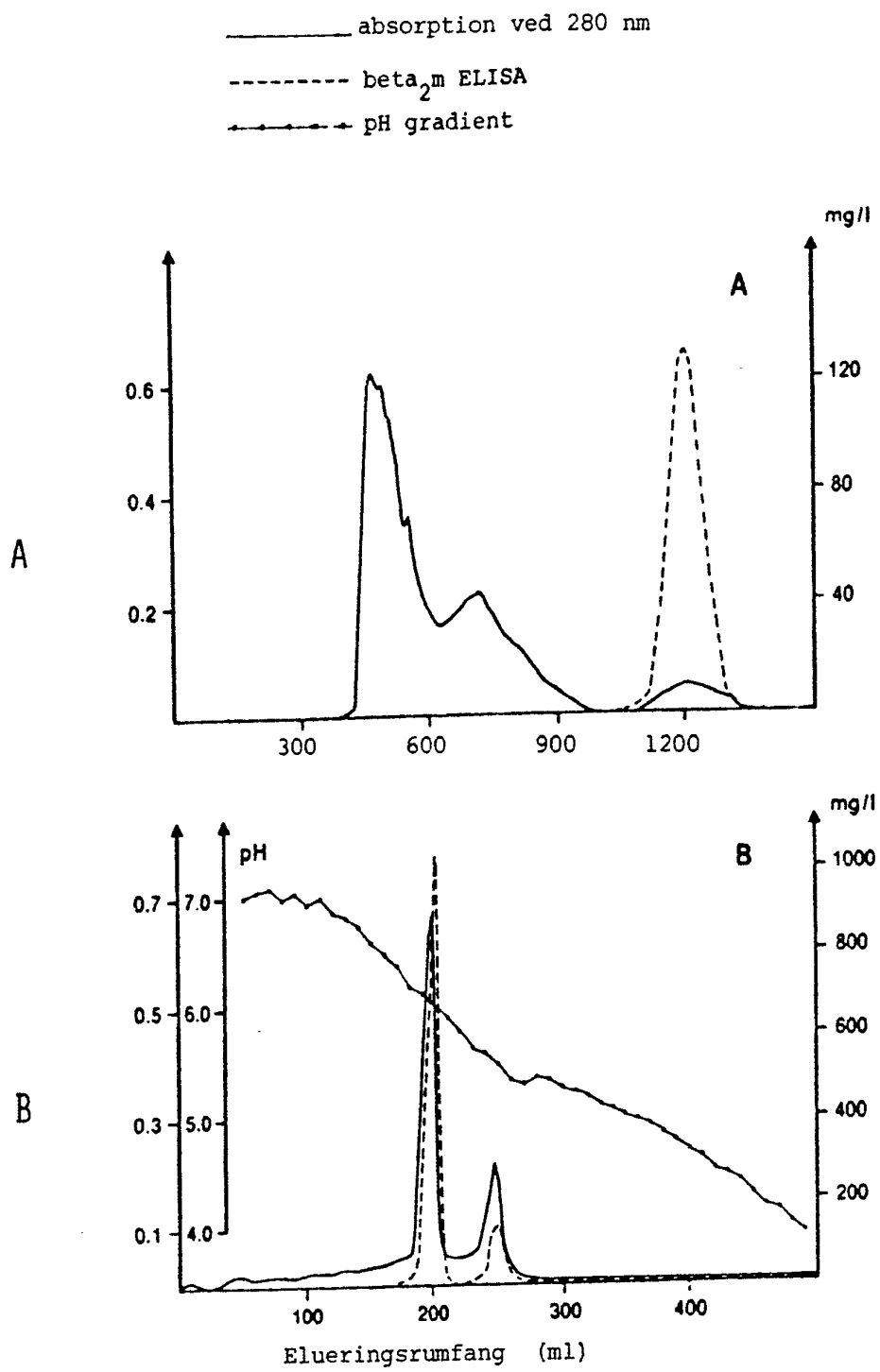


FIG. 3

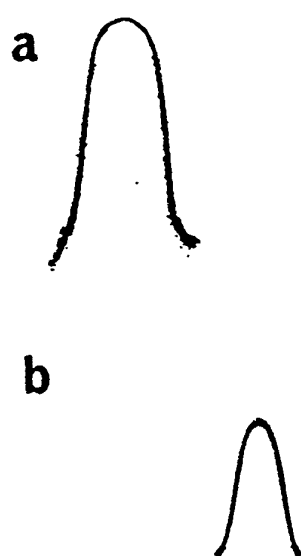


FIG. 4

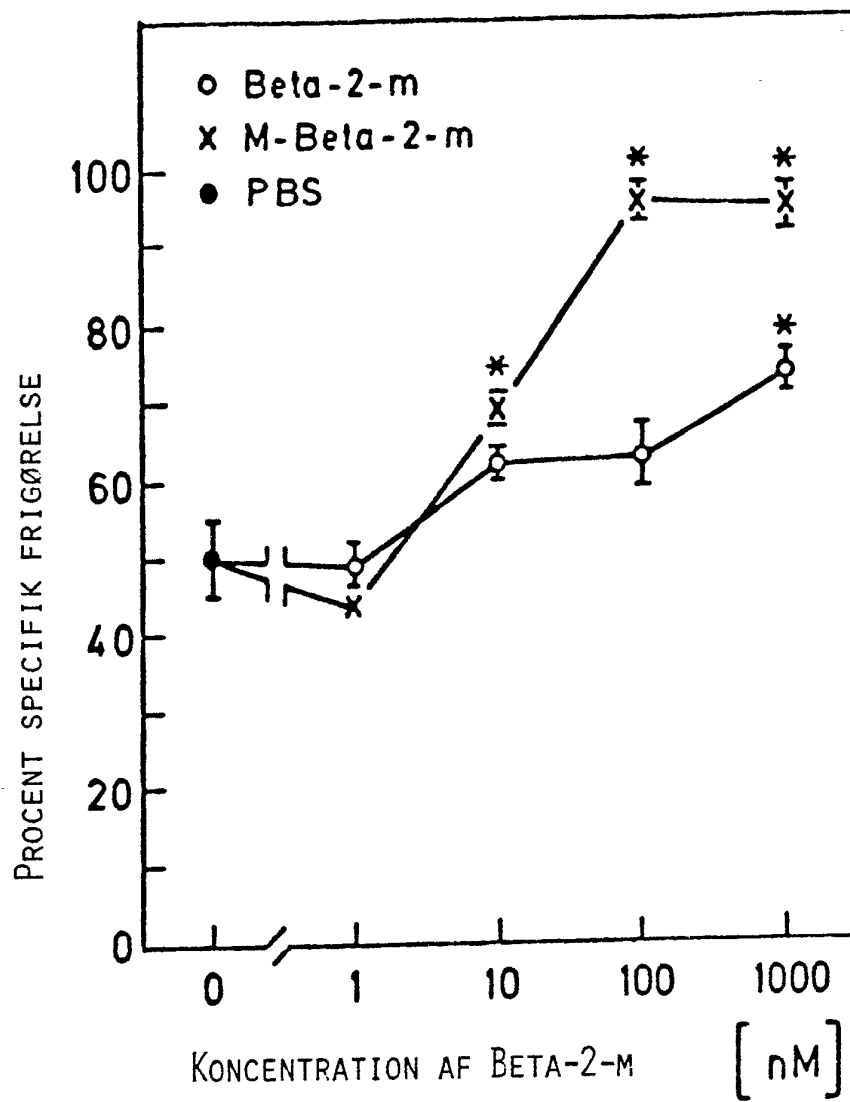


FIG. 5