

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlekningsskrift nr. 123108

Int. Cl. G 01 n 27/26 kl. 421-3/06

Patentsøknad nr. 170.695 Inngitt 24.XI.1967

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII.1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 27.IX.1971

Prioritet begjært fra: 25.XI.1966 Sverige,
nr. 16212/66

Aktiebolaget KABI,
Lindhagensgatan 133, Stockholm K, Sverige.

Oppfinnere: Bengt Ragnar Gustaf Granstrand, Mörbyvägen 42,
Vallentuna,
og
Nils Hugo Vilhelm Nihlén, Mössebergsvägen 26, Bromma,
Sverige.

Fullmektig: Dr.ing. K.O. Berg.

Diagnostisk middel for kvantitativ bestemmelse av pattedyrs
gamma-globulin.

Nærværende oppfinnelse vedrører et diagnostisk middel for
kvantitativ bestemmelse av pattedyrs anti(human)gamma-globuliner
som er blitt modifisert ved kjemisk å blokkere deres tilgjenge-
lige aminogrupper og derved markert å øke deres elektrofore-
tiske mobilitet uten vesentlig å redusere deres immunologiske
reaksjonsevne.

Uttrykket "gamma-globuliner" eller "gamma-globulin" omfatter
en eller flere av de spesielle arter pattedyrs gamma-globuliner
også kjent som γA , γD , γG og γM eller IgA, IgD, IgG og
IgM (Ig = immunoglobulin).

En immuno-elektroforetisk metode (i det følgende kalt "Laurell metoden") for kvantitativ bestemmelse av human albumin er blitt beskrevet av Carl-Bertil Laurell i *Analytical Biochemistry*, bind 15, (1966), s. 45-52.

Forskjellen i elektroforetisk mobilitet mellom albumin og pattedyrs gamma-globulinfraksjon kan uttrykkes ved cm/sek. pr. volt/cm. Mobilitetstallet for albumin er 0,000059 sammenlignet med 0,000012 for gamma-globulinfraksjonen, når undersøkt i et dietylbarbiturat-puffersystem ved fri elektroforese.

Laurell metoden er basert på forskjellen i elektroforetisk mobilitet av (1) den hurtig vandrende albuminfraksjon i human serum og (2) den antialbuminholdige antistoff-fraksjon i animalsk antiserum, som er den langsomt vandrende gamma-globulinfraksjon.

Når imidlertid en human gamma-globulinfraksjon injiseres i et dyr, f.eks. en geit, utvikler antistoffer mot det humane gamma-globulin seg i gamma-globulinfraksjonen i serumet hos det injiserte dyr. Gamma-globuliner av forskjellige pattedyrs opprinnelse viser den samme elektroforetiske mobilitet. Derfor da ingen forskjell foreligger mellom dem med hensyn til elektroforetiske mobiliteter, kan Laurell's diagnostiske metode for albumin ikke brukes for analyse av humane gamma-globulinnivåer.

Fra et klinisk synspunkt er laboratoriediagnose av patologiske forandringer i gamma-globuliner av betraktelig større betydning enn en bestemmelse av albuminnivået, da avvikelser fra normale mengder gamma-globuliner er forbundet med alvorlige sykdomstilstander.

Nærværende oppfinnelse løser problemet å bestemme pattedyrs gamma-globuliner ved at det fremskaffes forøket elektroforetisk mobilitet, f.eks. hos pattedyrs anti(human)-gamma-globulin, og derved muliggjøres oppnåelse av forskjeller utover elektroforetisk vandring, og alt uten vesentlig reduksjon av immunologisk reaksjonsevne.

En gamma-globulinfraksjon av human serum, enten IgA, IgD, IgG eller IgM, individuelt eller som blandinger av disse, injiseres i et egnet dyr, f.eks. marsvin, geit, kanin, rotte eller får. Dyret utvikler antistoffer mot den fremmede (human) proteinfraksjon. Under iakttagelse av forutsetningene for fremstillingen av antisera tas blod ut og behandles for å gi serum eller gamma-globulinfraksjonen som inneholder antistoffene mot den humane gamma-globulinfraksjon som anvendes for immuniseringen.

Det diagnostiske middel ifølge nærværende oppfinnelse for kvantitativ bestemmelse av pattedyrs gamma-globulin karakteriseres ved at middelet består av immunologisk adekvate pattedyrs antigamma-globuliner, hvor minst $1/5$ til maksimalt $4/5$ av de lett tilgjengelige frie aminogrupeer i globulinet er kjemisk blokkert, hvorved den elektroforetiske mobilitet for globulinet økes vesentlig over dets bevegelighet uten den nevnte kjemiske blokkerende modifikasjon.

Blokkeringen av de lett tilgjengelige, frie aminogrupeer av antigamma-globulinfraksjonen utføres ved å blande antigamma-globulinfraksjonen med et alifatisk, acylerende middel i slike forhold at det gir den ønskede grad av blokkering av de frie aminogrupeer under reaksjonsbetingelsene, tillater dem å reagere sammen, med fordel under kjøling, i tilstrekkelig tid for at reaksjonen skal bli fullført. Deretter skilles den således karboksyalkylacyl-substituerte, forandrede antigamma-globulinfraksjon fra.

Det er gunstig å utføre reaksjonen mellom den blokkerende reaksjonskomponent og antigamma-globulinfraksjonen under alkaliske betingelser, effektivt ca. pH 8, opp til f.eks. ca. pH 8,5. Den amino-gruppe-blokkerte, sluttproduktmodifiserte antigamma-globulinfraksjon skilles med fordel fra ved å dialysere ut de dialyserbare øvrige bestanddeler i reaksjonsblandingen med fordel mot en saltoppløsning, effektivt fysiologisk saltoppløsning. Sluttproduktet kan deretter fjernes fra den vandige reaksjonsbærer ved egnede midler, av hvilke lyofilisering synes å være den mest effektive.

123108

4

Ved således kjemisk å modifisere antiserumet eller dets anti-gamma-globulinfraksjon forandres den elektroforetiske mobilitet for antigamma-globulinfraksjonen og gir derved produkter som har øket elektroforetisk mobilitet i sammenligning med den ubehandlede fraksjon og uten vesentlig å redusere dets immunologiske reaksjonsevne.

Egnede acylerende forbindelser for kjemisk å påvirke denne frie aminogruppeblokkerende modifikasjon er f.eks. enhver av de alifatiske dikarboksylsyrer, hvor karbonkjedelengden ikke overstiger 10 karbonatomer, slik som ravsyre, maleinsyre, fumarsyre, glutarsyre, adipinsyre, pimelinsyre, suberinsyre, azelainsyre og sebacinsyre.

Således, ved å omdanne mesteparten eller en del av de lett tilgjengelige aminogrupper i antigamma-globulinfraksjonen til karboksyalkyl-karbamidgrupper meddeles en øket elektroforetisk mobilitet til den slik modifiserte fraksjon, mens samtidig dens immunologiske egenskaper er opprettholdt adekvat. Uttrykt som elektroforetisk mobilitet oppnås en økning i mobilitet på opp til over størrelsesordenen for mobiliteten for albumin uten dog å redusere den immunologiske reaksjonsevne for antigamma-globulinet.

En gunstig størrelsesorden for aminogruppeblokkering er fra 1/5 til 4/5 av de lett tilgjengelige aminogrupper i antigamma-globulinet. Dette resulterer i en mobilitet på 0,00002 til 0,00008 cm/sek. pr. volt/cm i fri elektroforese i et standardisert system. De respektive mobilitetsverdier ved forskjellige nivåer for aminogruppeblokkering, som vist ved gelelektroforese og sammenlignet med albumin, er satt opp i eksempel 2 nedenfor.

Antallet av lett tilgjengelige aminogrupper som ikke blokkeres kan bestemmes etter kjemisk blokkeringsreaksjon med f.eks. ravsyreanhydrid (som i eksempel 1) etter metoden av A.F.S.A. Habeeb i Analytical Biochemistry, bind 14, (1966), s. 328-336, Academic Press, New York, ved anvendelse av 2,4,6-trinitrobenzensulfonsyre.

EKSEMPEL 1

Ravsyreanhydridblokkerende middel: 600 mg geit anti(human)gamma-globulinfraksjon ble oppløst i 30 ml fysiologisk saltoppløsning under omrøring. pH-verdien for oppløsningen ble justert til 8,2 med kaliumhydroksydvandig oppløsning. 5 ml av den opprinnelige oppløsning ble satt til side for sammenlignende elektroforese.

Til de gjenværende 25 ml ble tilsatt 125 mg ravsyreanhydrid under omrøring og kjøling i et isbad. pH for reaksjonsblandingen ble holdt konstant ved ca. pH 8 med kaliumhydroksyduppløsning. 2 timer fikk forløpe for fullendelse av reaksjonen, fulgt av dialyse mot fysiologisk saltoppløsning i 24 timer og lyofilisering av residuet.

Det resulterende succinylderivat av geit anti(human)gamma-globulinet ble oppløst i vann til en konsentrasjon på 2%. Under 2 timers sammenlignende elektroforese vandret den opprinnelige gamma-globulinoppløsning ikke, mens det succinylmodifiserte preparat beveget seg ca. 5,5 cm i sammenligning med ca. 4,5 cm for albumin. Adekvat immunologisk reaksjonsevne overfor human gamma-globulin av den art som anvendes for immuniseringen var opprettholdt av dette succinylderivat av dette antigamma-globulin.

EKSEMPEL 2

Forskjellige forhold for blokkerende middel: En prøveserie ble utført med anti(human)gamma-globulin med frie aminogruupper på lignende måte blokkert med ravsyreanhydrid etter metoden i eksempel 1 for å illustrere forholdet mellom antallet blokkerte aminogruupper og den elektroforetiske mobilitet for de resulterende modifiserte antigamma-globuliner. De følgende resultater ble oppnådd.

123108

6

Mengde ravsyre- anhydrid anvendt pr. ml antigamma- globulin (2%) opp- løsning som i eks. 1	Elektroforetisk mobilitet i aga- rosegel i forhold til albumin	Immunologisk reaksjonsevne for forandret antigamma-globu- lin
0	10%	--
0,1 mg	15%	adekvat
0,3 mg	25%	"
1 mg	75%	"
5 mg	135%	"
10 mg	150%	redusert

Blokkeringen av fra ca. 1/5 til ca. 4/5 av de lett tilgjengelige aminogrupeer i antigamma-globulinfraksjonen fra immuniserte dyr meddeler en egnet elektroforetisk mobilitet til fraksjonen for å muliggjøre vurdering av prøvene som inneholder humane gamma-globuliner som beskrevet nedenfor. Bestemmelsen av lett tilgjengelige aminogrupeer er metoden etter A.F.S.A. Habeeb (som angitt på side 6 foran) under anvendelse av 2,4,6-trinitrobenzensulfonsyre.

EKSEMPEL 3

Ravsyreanhydridblokkerende middel under anvendelse av fosfat-

puffer: 10 ml geit anti(human)gamma-globulinserum ble blandet med 20 ml fysiologisk fosfatpuffer. Oppløsningen ble kjølt i et isbad og 5 mg/ml ravsyreanhydrid ble tilsatt under omrøring.

pH-verdien for reaksjonsblandingen ble holdt konstant ved ca. pH 8 med kaliumhydroksydoppløsning. Etter 1 times reaksjonstid ble oppløsningen dialysert (som i eksempel 1) i 20 timer fulgt av vakuumfrysetørking av residuet. En immuno-elektroforetisk prøve av en 2%'s vandig oppløsning av det resulterende succinylpreparat viste nærværet av adekvat immunologisk reaksjonsevne med humant gamma-globulin, og dets økte mobilitet tillot en kvantitativ bestemmelse av det humane gamma-globulin som er tilstede i en ukjent prøve.

Ravsyreanhydridet i eksemplene 1 og 2 kan erstattes av en tilsvarende mengde av anhydridet av de øvrige her angitte toverdige syrer, og hver av disse eksempler betraktes som satt opp også for disse, hvorved hvert viser tilsvarende resultater til dem som er angitt i eksempel 1 og 2.

Hvert slikt anhydrid kan likeledes også erstattes med et annet acylerende derivat av hver av disse toverdige syrer, slik som tilsvarende monoacylhalogenider henholdsvis monoacylklorider. Deretter kan de tilgjengelige frie aminogrupper blokkeres på lignende måte ved separat omdannelse henholdsvis med hvert slikt monoacylklorid under egnede acylerende betingelser for slik acylering med et acylhalogenid for å danne de respektive tilsvarende karboksyalkylkarbamidgrupper.

Laboratorieteknikk for vurdering av pattedyrs gamma-globuliner:

Et 2 mm's tykt ark av 1%'s agarose (sukkerkomponenten i agar-agar) eller agar (også kjent som agar-agar) oppløst i dietylbarnbitursyrepuffer (ionestyrke 0,07; 0,002 M kalsiumlaktat; pH = 8,6) støpes på en glassplate 120 x 120 mm, slik som beskrevet av Carl-Bertil Laurell (som angitt foran side 2). Når agarose- eller agararket har herdet, fjernes en del av de på 95 x 25 mm graden sentrale del av arket for å gi et baseng.

I dette baseng støpes et 2 mm's tykt ark av pufret 1%'s agarose eller agar, som også var tilsatt det aminogruppeblokkerte antigamma-globulin. Når arket har herdet punches en rekke 2 mm's huller med ca. 5 til 10 mm's avstand for å tjene som mottagersteder for undersøkelsesprøver. Avstanden fra basengkanten til hullsentret holdes på ca. 4 mm. Tilsammen lages ca. 12 til 20 huller tilgjengelige på en standardplate.

Ifølge et alternativ for å utføre den immuno-elektroforetiske bestemmelse anvendes agaroseark som bærer. Et hurtig bevegelig aminogruppeblokkert globulin med en mobilitet av størrelsesordenen for globulin foretrekkes ved dette alternativ. Platen med agarosearket anbringes i et elektroforeseapparat med antigamma-globulinholdig baseng som bærer hullene nærmest

123108

8

anoden (+). Agarosearket forbindes med elektrolytten for det respektive elektroderør.

Et samme volum, fortrinnsvis innen området 4 til 10 mikroliter, av en human gamma-globulinstandard eller en human serumprøve avdeles til hvert av de utstansede huller for bruk ved standard- eller undersøkelseprøve, og elektroforesen settes i gang og får fortsette i 100 minutter ved en spenningsreduksjon på 10 volt/cm uten kjøling.

Etter avslutning av elektroforesen fjernes eventuelt gjenværende overskudd av ethvert av de oppløselige proteiner fra hullene med fysiologisk saltoppløsning. Agarosearket tørkes derpå og flekkes med et egnet flekkingsmiddel for proteiner, slik som amidoblack, azocarmin eller bromfenolblått.

Fra hullene i arket hvor de separate fortynnelser av humant gamma-globulinstandard henholdsvis den ukjente undersøkelsesprøve av human serum er avsatt, utgår presipitattopper i retning mot anoden i basenget som bærer det modifiserte antigamma-globulin.

Ifølge et annet alternativ anvendes agar som bærer. Ubehandlet gamma-globulin såvel som ubehandlet antigamma-globulin oppviser elektro-osmotisk mobilitet i agargel i retning av katoden.

Anvendelse av et bare moderat aminogruppeblokkert antigamma-globulin som har en bevegelighet i forhold til albumin på ca. 15% til 25% kompenserer for den osmotiske mobilitet og etterlater antigamma-globulinet ubevegelig. Hullene for mottagelse av de individuelle fikserte volumer av de separate oppløsninger av standard gamma-globuliner henholdsvis undersøkelsesserumet punches utenfor den antigamma-globulinholdige og basenget som vender mot katoden (-). Ved elektroforese utgår presipitattopper når gamma-globulinene beveger seg i basenget som bærer de ubevegelige kjemisk modifiserte antigamma-globuliner.

EKSEMPEL 4Laboratoriebestemmelse av pattedyrs gamma-globuliner:

Arbeidsmåten som er beskrevet foran anvendes for å bestemme gamma-globulinnivået i humane serumprøver i serie fortynnet med fysiologisk saltoppløsning, nemlig 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32.

Til agarosebasenget tilsettes 1% av det kjemisk modifiserte geit anti(human)gamma-globulin som oppnås ifølge eksempel 1 eller 2.

For å vurdere undersøkelsesprøvene avsettes standard humane gamma-globulinoppløsninger med konsentrasjonene 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; og 0,8% i de punchede huller.

Høyden for de separate henholdsvis utgatte presipitattopper måles etter ca. 1 til 2 timers elektroforese. Høyden av toppene for de kjente prøver anvendes for å vurdere mengden av gamma-globulin i hver av de forskjellige fortynnelser av de ukjente undersøkelsesprøver.

EKSEMPEL 5Laboratoriediagnose med modifisert geit antigamma-globulinserum:

En vurdering av gamma-globulinnivået i en human serumprøve ble utført ifølge arbeidsmåten som er beskrevet i eksempel 4.

2% av det kjemisk modifiserte geit anti(human)gamma-globulinserum som oppnås i eksempel 3 ble tilsatt til agarbasenget.

Fortynningene av standard gamma-globulinet såvel som av de ukjente undersøkelsesprøver var de samme som i eksempel 4. Tre ukjente serumprøver ble undersøkt, av hvilke en var tatt ut fra en frisk frivillig, en annen fra en pasient med kliniske tegn på gammaglobulinemia, og en tredje fra en pasient med antatt hypogammaglobulinemia som fremtrer som periodiske øvre åndedrettsinfeksjoner.

Den første prøve ble funnet å inneholde 12 mg/ml, den annen

123108

10

prøve 0,1 mg/ml og den tredje 3 mg/ml gammaglobulin og bekrefter således de kliniske funn.

P a t i e n t k r a v

1. Diagnostisk middel for kvantitativ bestemmelse av pattedyrs gamma-globulin, k a r a k t e r i s e r t v e d at midlet består av immunologisk adekvate pattedyrs antigamma-globuliner, hvor minst 1/5 til maksimalt 4/5 av de lett tilgjengelige, frie aminogrupeer i globulinet er kjemisk blokkert, hvorved den elektroforetiske mobilitet for globulinet økes vesentlig over dets bevegelighet uten den nevnte kjemiske, blokkerende modifikasjon.
2. Diagnostisk middel etter krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminogrupeene kjemisk blokkeres ved å ha bundet til nitrogenatomet i nevnte grupper et monoacylradikal, som er en dikarboksylsyre med fra 2 til 10 karbonatomer, idet bindingen er med karbonatomet ved enden av karbonylgruppen i monoacylradikalet.
3. Diagnostisk middel etter krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at dikarboksylsyren er ravsyre.
4. Diagnostisk middel som angitt i krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at antigamma-globulinene har en elektroforetisk mobilitet på fra ca. 0,00002 til ca. 0,00008 cm/sek. pr. volt/cm i en fri dietylbarbituratpuffer i en fri elektroforese.

5. Diagnostisk middel etter krav 4, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at antigamma-globulinene er antigamma-
globulinfraksjonen slik som de inneholdes i et antigamma-
globulinserum.

Anførte publikasjoner: -