



(11) FREMLÆGGESESSKRIFT 142146

DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(51) Int. Cl.³ C 07 G 7/00
G 01 N 33/94

(21) Ansøgning nr. 4433/73 (22) Indleveret den 10. aug. 1973

(24) Løbedag 12. maj 1971

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggeskriftet offentliggjort den 8. sep. 1980

(30) Prioritet begæret fra den
13. maj 1970, 36999, US

(71) F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESSELLSCHAFT, Grenzacherstrasse 124-184, Postfach, CH-4002 Basel, CH.

(72) Opfinder: Sidney Spector, 12 Troy Drive, Livingston, N.J., US.

(74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Plougmann & Vingtoft Patentbureau.

(54) Opiumsalkaloid-specifikt antistof til brug ved påvisning af et opiumsalkaloid i en biologisk væske.

Den foreliggende opfindelse angår et hidtil ukendt opiumsalkaloid-specifikt antistof til brug ved påvisning af et opiumsalkaloid i en biologisk væske.

Den kraftige udbredelse af befolkningens anvendelse af narkotiske midler, herunder opiumsalkaloiderne, har medført et betydeligt behov for at forbedre de analytiske metoder til bestemmelse af sådanne midler i biologiske væsker. I mange tilfælde har medicinske behandlingscentre behov for at bestemme identiteten af et narkotisk middel, som er indtaget af en patient, der, da han eller hun er i comatøs tilstand, ikke er i stand til at meddele den behandlende læge de hertil nødvendige oplysninger. De kendte metoder til identifikation af opiumsalkaloider omfatter ekstraktion og tyndtlagschromatografi.

Disse metoder har den ulempe, at de er forholdsvis tidsrøvende og arbejdskrævende og uden større følsomhed. En mere hurtig og højfølsom prøve for tilstedeværelsen af opiumsalkaloider i biologiske væsker ville således betegne et overordentligt vigtigt fremskridt på området, og med det opiumsalkaloid-specifikke antistof ifølge opfindelsen muliggøres sådanne hurtige og højfølsomme prøver.

Man har i nogen tid vidst, at forskellige små molekyler (haptener), som i sig selv er fuldstændig frie for antigenicitet, kan modificere et proteins antigene egenskaber, når det lille molekyle kombineres med proteinet gennem stabile covalente bindinger. Det beskrives således i USA patentskrift nr. 2.372.066, at der kan fremstilles modificerede antigener ved at kombinere histaminer eller histaminlignende forbindelser ved sammenknytning af imidazolringen med et ønsket protein gennem et radikal, som indeholder en gruppe, der kan koble med proteinet. Disse modificerede antigener anvendes enten ved direkte injektion i et subjekt, hvorved der udvikles modstandsdygtighed, refraktaritet eller aktiv immunitet i subjektet, eller til injektion i værtsorganismer, af hvilke der udvikles antistoffer, som er specifikke over for haptendelen, f.eks. histaminet eller det histaminlignende stof. Endvidere har Landsteiner i en artikel med titlen "Specificity of Serological Reactions", Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts (1945) beskrevet udnyttelsen af p-aminobenzen-arsensyre som haptent, som, når den kobles til et protein, er i stand til at fremkalde specifikke antistoffer i en animalsk værtsorganisme.

Det har nu ifølge opfindelsen vist sig, at der kan tilvejebringes opiumsalkaloid-specifikke antistoffer, når et værtsdyr podes med et modificeret antigen af den art, som er beskrevet i dansk patent ans. nr. 2282/71, og at disse opiumsalkaloid-specifikke antistoffer selektivt vil danne complex med et opiumsalkaloid, et carboxy-C₁₋₆-alkylderivat af den phenoliske hydroxylgruppe i et opiumsalkaloid eller et opiumsalkaloid-antigen bestående i det væsentlige af et carboxy-C₁₋₆-alkylderivat af den phenoliske hydroxylgruppe i opiumsalkaloidet bundet gennem peptidbindinger til aminogrupper i et immunogenisk protein.

Opfindelsen angår således et opiumsalkaloid-specifikt antistof til brug ved påvisning af et opiumsalkaloid i en biologisk væske, hvilket antistof er ejendommeligt ved, at det består af et gammaglobulinfraktionprotein med en molekylvægt på ca. 160.000 og indeholdende et flertal af steder, som selektivt vil danne complex med

et opiumsalkaloid, et carboxy- C_{1-6} -alkylderivat af den phenoliske hydroxylgruppe i et opiumsalkaloid eller et opiumsalkaloid-antigen bestående i det væsentlige af et carboxy- C_{1-6} -alkylderivat af den phenoliske hydroxylgruppe i opiumsalkaloidet bundet gennem peptidbindinger til aminogrupper i et immunogenisk protein, hvilket opiumsalkaloid-specifikke antistof er fremstillet ved at pøde et værtsdyr med det nævnte antigen, udvinde serum fra værtsdyret og udfælde antistoffet derfra.

Det nævnte opiumsalkaloid-antigen betegnes i det følgende også det modificerede antigen og dets fremstilling er beskrevet detaljeret i dansk patent ans. nr. 2282/71.

Det særlig foretrukne opiumsalkaloid, mod hvilket antistoffet ifølge opfindelsen er rettet, er morphin. Andre egnede opiumsalkaloider er f.eks. heroin og codein samt derivater deraf, som ikke involverer den phenoliske hydroxylgruppe. Det har vist sig, at de antistoffer, der fremkaldes ved anvendelse af et morphinhapten-proteinantigen, ikke blot er specifikke over for morphin, men også over for nært beslægtede derivater såsom codein og i mindre grad nalorpin.

Antistoffet ifølge den foreliggende opfindelse fremstilles ved, at det modificerede antigen injiceres i et værtsdyr gentagne gange over et tidsrum, serummet udvindes, antistoffet udfældes med en neutral saltopløsning, og antistoffet renses, om ønsket, ved dialyse og søjlechromatografi.

Velegnede værtsdyr til dette formål er pattedyr såsom kaniner, heste, geder, marsvin, rotter, køer og får. Det resulterende antistof vil selektivt danne complex med opiumsalkaloider, det ovenfor beskrevne modificerede opiumsalkaloidantigen eller nært beslægtede derivater.

Dannelsen af opiumsalkaloid-specifikke antistoffer i værtsdyrene kan følges ved, at man udtager blodprøver fra værtsdyret og tilsætter dem en portion af det modificerede opiumsalkaloidantigen. Fremkomsten af bundfald viser antistofaktivitet. Antigenbehandlingen af dyret kan fortsættes, indtil antistoftiteren når et ønsket aktivitetsniveau. "Antistoftiteren" skal her betegne den maksimale koncentration af udfældet protein efter tilsætning af forskellige kendte koncentrationer af antigener til bestemte rumfang serum, f.eks. 0,5 ml.

Antistofferne ifølge den foreliggende opfindelse kan isoleres fra sera fra behandlede værtsorganismer under anvendelse af metoder, som er

velkendte i den biokemiske teknik. Således kan f.eks. sera vundet ved behandling af værtsorganismer behandles med et neutralt salt, som vil fremkalde udfældning af de ønskede specifikke antistoffer. Egnede neutrale salte til dette formål er natriumsulfat, magnesiumsulfat, en natriumhydrogenphosphatblanding eller ammoniumsulfat. Det til den foreliggende opfindelses formål foretrukne neutrale salt er ammoniumsulfat. Efter udfældningen kan der også foretages en rensning, f.eks. ved dialyse eller søjlechromatografering. Det resulterende antistof kan karakteriseres som en gammaglobulin med en molekylvægt på ca. 160.000. Dette antistof vil med en høj grad af specificitet danne complex med opiumsalkaloid-haptener og deraf afledte antigener.

De specifikke antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse er vel-egnede som reagenser til biokemiske prøver til bestemmelse af tilstedeværelsen af opiumsalkaloider og nært beslægtede forbindelser i biologiske væsker. En særlig foretrukken prøvemethode er en immuno-præcipitationsmetode, der kan anvendes til måling af nanogram-mængder opiumsalkaloid, f.eks. morfin, i serum. Ved denne metode blandes en kendt mængde mærket opiumsalkaloid med opiumsalkaloid-antistof og en prøve indeholdende den ukendte mængde opiumsalkaloider. Mængden af opiumsalkaloid i prøven kan bestemmes ved måling af den grad af konkurrerende inhibition, som iagttages mellem bindingen mellem henholdsvis det mærkede opiumsalkaloid og prøvens opiumsalkaloid og det opiumsalkaloid-specifikke antistof, og beregning af mængden af opiumsalkaloid i prøven på grundlag af en standardkurve. Egnede mærkede opiumsalkaloider til anvendelse til dette formål er f.eks. de isotopisk mærkede opiumsalkaloider, især tritierede opiumsalkaloider, dvs. dihydromorfin- H^3 og morfin- I^{125} , samt opiumsalkaloider, som er mærkede med en elektronspin-resonansgruppe. Eksempler på anvendelsen af forskellige elektronspin-resonans-mærkede molekyler i biokemiske prøver findes i USA patentskrifterne nr. 3.453.288, 3.481.952 og 3.507.876. En foretrukken radioimmunopræcipitationsmetode til anvendelse til bestemmelse af opiumsalkaloider beskrives mere detaljeret i eksempel 2, medens eksempel 1 belyser fremstillingen af antistoffet ifølge opfindelsen.

Eksempel 1.

Fremstilling af antistof.

Kaniner af New Zealand-albinostammen immuniseres med 1 mg carboxy-methylmorphin-BSA, fremstillet som beskrevet i dansk patent ans.

nr. 2282/71. Immunogenet opløses i en phosphatpuffer-saltopløsning med pH-værdi 7,4, emulgeres med et lige så stort rumfang Freund's komplette adjuvans og injiceres i trædepuden (0,4 ml/trædepude). Forstærkningsinjektioner på 100 μ g antigen i adjuvans gives hver 6. - 8. uge i trædepuden og siderne.

Antiserum høstes 5 - 7 dage efter forstærkningsinjektionerne. Blod, som opsamles ved hjertepunktur, inkuberes ved 37°C i 1 time og holdes derefter natten over ved 4°C. Efter centrifugering ved 5000 omdrejninger pr. minut i 30 minutter ved 4°C skilles serummet fra klumperne.

Udfældning af antistoffet foretages som beskrevet på side 4.

Eksempel 2.

Radioimmunoprøve.

Radioimmunoprøven udføres ved, at forskellige fortyndinger af antisera fremstillet som beskrevet i eksempel 1 inkuberes i nærværelse af dihydromorfin- H^3 (New England nuclear, 388 mc/mM), 100 picomol (4000 cpm) ved 4°C natten over. Efter inkubering sættes der en neutral mættet ammoniumsulfatopløsning (samme rumfang som inkubationsmediet) til alle glas. Bundfaldet, som sedimenteres ved centrifugering ved 5000 omdrejninger pr. minut i 15 minutter ved 4°C, vaskes to gang i 50%'s ammoniumsulfatopløsning. Det vaskede bundfald, som indeholder antistof-bundet morfin, opløses i 0,5 ml kommercielt detergent som opløseliggørende middel og overføres kvantitativt til og tælles i et Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer. Et glas, som indeholder radioaktivt dihydromorfin og et antiserum (fremstillet som beskrevet i eksempel 1), men intet ikke-mærket morfin, tjener som mål for den maksimale antistof-bundne radioaktivitet. Ved tilsætning af stigende mængder ikke-mærket morfin til en bestemt mængde dihydromorfin- H^3 og antiserum opnås konkurrerende inhibition af det mærkede dihydromorfin med hensyn til dannelsen af antistof-hapten-complexet. De konstaterede data fremgår af nedenstående tabel I:

Tabel I

Nanogram ikke-radioaktivt morphin tilsat	Procentvis inhibition af bin- dingen af dihydromorphin-H ³
0,5	20
2,0	38
3,0	50
4,0	65
5,0	80

De ovenstående data viser klart metodens følsomhed. Ved optegning i grafisk kurveform viser de i ovenstående tabel indeholdte data en lineær relation mellem mængden af tilsat ikke-radioaktivt morfin og den fundne procentmæssige inhibition. Ved tilsætning af 0,5 nanogram ikke-mærket morfin pr. glas (en koncentration på 1 nanogram pr. ml før tilsætning af ammoniumsulfat) fortrænges 20% af det mærkede dihydromorphin fra antistoffet. Antiserummets specificitet for morfin påvises ved inkubation af den mærkede hapten med normal kaninserum. Den radioaktivitet, som bliver tilbage i et bundfald fra normalt kaninserum efter vaskning, ligger svagt over baggrundsradioaktiviteten og subtraheres fra de værdier, som konstateres på alle de andre glas.

Der udføres også sammenligningsforsøg med andre alkaloider. Den inhiberende virkning af codein, som er morfin-3-methylether, sammenlignes med morphins inhiberende virkning. Codein viser sig at være endog mere effektivt end morfin (på molær basis) med hensyn til at give 50% inhibition af udfældningen af radioaktivt materiale. Dette er ikke overraskende, eftersom codein har større strukturel lighed med den immuniserende carboxymethylmorphingruppe end morfin selv. Det viser sig endvidere, at 500 nanogram nalorfin nedsætter udfældningen af radioaktivitet med ca. 35%, medens den samme mængde methadon giver ringe eller ingen inhibition.

Patentkrav.

Opiumsalkaloid-specifikt antistof til brug ved påvisning af et opiumsalkaloid i en biologisk væske, k e n d e t e g n e t ved, at det består af et gammaglobulinfraktionprotein med en molekylvægt på ca. 160.000 og indeholdende et flertal af steder, som selektivt vil danne complex med et opiumsalkaloid, et carboxy-C₁₋₆-alkylderivat af den phenoliske hydroxylgruppe i et opiumsalkaloid eller et opiumsalkaloid-antigen bestående i det væsentlige af et carboxy-C₁₋₆-alkylderivat af den phenoliske hydroxylgruppe i opiumsalkaloidet bundet gennem peptidbindinger til aminogruupper i et immunogenisk protein, hvilket opiumsalkaloid-specifikke antistof er fremstillet ved at pøde et værtsdyr med det nævnte antigen, udvinde serum fra værtsdyret og udfælde antistoffet derfra.

Fremdragne publikationer:
