



C (45) 1987
Patent- och registerstyrelsen

(51) Kv.lk.⁴/Int.Cl.⁴ G 01 N 33/92, 33/68

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21)	Patentihakemus - Patentansökning	831359
(22)	Hakemispäivä - Ansökningsdag	21.04.83
(23)	Alkupäivä - Giltighetsdag	21.04.83
(41)	Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	24.10.83
(44)	Nähtäväksipanon ja kuuljulkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.11.88
(86)	Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32) (33) (31)	Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	23.04.82
Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) P 3215310.4 Toteennäytetty-Styrkt		

(71) Boehringer Mannheim GmbH., Sandhofer Strasse 112-132, Mannheim-Waldhof,
Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)

(72) Joachim Ziegenhorn, Starnberg, Sigbert Schiefer, Pähl,
Brigitte Dräger, Tutzing, Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE)

(74) Berggren Oy Ab

(54) Menetelmä pienen tiheyden omaavien lipoproteiinien (LDL) määrittämiseksi
ja sen suorittamisessa tarvittava reagenssi - Förfarande för bestämning
av lågdensitetslipoproteiner (LDL) i kroppsvätskor och reagens för
utförande därav

(57) Tiivistelmä

Pienen tiheyden omaavien lipoproteiinien (LDL) määrittystä
varten ruumiin nesteistä lisätään tutkittavaan näytteeseen
suuren tiheyden omaavan lipoproteiinin (HDL)-vasta-ainetta,
erotetaan muodostunut liukenematon osa ja määrätään yläpuo-
lella olevasta nesteestä LDL tai jokin sen komponenteista,
kuten esimerkiksi kolesteriini.

(57) Sammandrag

För bestämning av lågdensitetslipoproteiner (LDL) i kropps-
vätskor tillsättes i provet som skall undersökas högdensi-
tetslipoprotein (HDL)-antikroppar, den uppkomna olösliga
delen separeras och LDL eller någon av dess komponenter,
såsom exempelvis kolesterol bestäms i supernatanten.

Menetelmä pienen tiheyden omaavien lipoproteiinien (LDL) määrittämiseksi ja sen suorittamisessa tarvittava reagenssi

Keksintö koskee menetelmää ja reagenssia pienen tiheyden omaavien lipoproteiinien (LDL) määrittämistä varten.

LDL-fraktion (low density lipoproteine), jota kutsutaan myös β -lipoproteiinifraktioksi määrittäminen on saavuttanut huomattavan merkityksen lipidiaineenvaihduntahäiriön erotusdiagnoosissa.

Hyperkolesterinemia ja hypertriglyseridemia edistävät ateroskleroosin ja sydäninfarktin syntymistä. Kolesteriinin ja triglyseridien määrittäminen seerumista kuuluvat sen vuoksi kaikkiin useimmin suoritettuihin kokeisiin kliniskemiallisessa rutiinilaboratoriossa.

Useat rasva-aineenvaihdunnan tutkimukset tulevat siihen lopputulokseen, että yksityisen henkilön koronaaririski saadaan paremmin selville, jos määrätään ei ainoastaan triglyseridi- ja kolesteriinipeilin muutos vaan saadaan selville niiden pohjalla olevat patologiset siirtymät lipoproteiinimallissa (Munch.med.Wschr. 121, (1979) 1639).

Tunnetut plasmalipoproteiinit sisältävät eri suuruisen määrän proteiinia (apolipoproteiinia), fosfolipidejä, kolesteriinia ja triglyseridejä. Ne voidaan jakaa erilaisen käyttäytymisensä perusteella (erilainen tiheys) analyyttisessä ultrasentrifugissa ja erilaisen vaeltamisnopeutensa perusteella geelelektroforeesissa neljään eri luokkaan:

kylomikronit

pre- β -lipoproteiini = VLDL (very low density lipoproteiini)

β -lipoproteiini = LDL (low density lipoproteiini)

α -lipoproteiini = HDL (high density lipoproteiini)

Lipoproteiinien vaikutustavan tutkimuksesta on käynyt ilmi, että LDL on lipoproteiineissa ratkaiseva aterosgeeninen komponentti, jonka lisääntyessä veressä on olemassa suurempi riski koronaarisydäntaudin saamisesta. Tämän tilan varhainen tietäminen ja torjuminen on hyvin tärkeätä. Sen vuoksi on olemassa käyttökelpoisen menetelmän tarve, jolla voidaan suorittaa LDL-konsentraation kvantitatiivinen määrittäminen seerumista ja plasmasta.

Tähän asti on LDL-kolesteriiniarvon määrittämiseen käytetty pääasiassa kolmea menetelmää, joissa on kuitenkin varjopuolia:

1. Ultrasentrifugointi

Tämä menetelmä ei sovellu rutiinilaboratorioon, koska siihen tarvitaan erikoinen välineistö ja suoritus vaatii erittäin huolellista työskentelytekniikkaa ja hyvin paljon aikaa ultrasentrifugin kanssa (työläs sentrifugointi). Sen vuoksi tämä analyysimenetelmä on jäänyt tähän asti vain tutkivan lääketieteen laboratorioiden käyttöön.

2. Elektroforeettinen erottaminen ja siihen liittyvä lipoproteiinijuoventen näkyviin saaminen polyanionien saostamisen kautta ja samennusyksiköiden muuntaminen kolesteriiniarvoiksi.

Tämä menetelmä on kuitenkin aikaavieppä ja vaatii oman elektroforeesilaitteen sekä densitometrin tulkitsemista varten (Lab.Med.1, (1977) 145).

3. LDL-kolesteriini-arvon määrittäminen Friedewald-kaavan mukaan (Clin.Chem.18, (1972) 499).

LDL-kolesteriini-arvon laskemista varten Friedewald-kaavan mukaan on määrättävä kolme parametriä: näytteen kolesteriini-, HDL-kolesteriini- ja triglyseridiarvo. Menetelmä ei siis ole riittävän käyttökelpoinen. Sitä paitsi tämä ravintokaava pätee vain kylomikronivapaisiin näytteisiin ja näytteisiin, joiden triglyseridiarvot ovat alle 400 mg/dl.

4. Saostusreaktiot

Menetelmä, jossa LDL saostetaan lektiinin avulla, on selostettu DE-OS 2 857 710:ssa. Tässä menetelmässä kuitenkin voidaan LDL-kolesteriinin arvo saada selville vasta sakan uudelleen liuottamisen jälkeen eli kolesteriiniarvojen eroista ennen ja jälkeen saostamisen. Tämä merkitsee huomattavaa haittaa.

Lipoproteiinien saostamismenetelmä, jossa LDL jää sakan päällä olevaan nesteeseen, on selostettu DE-OS 2 600 664:ssä. Menetelmä ei kuitenkaan ole rutiinimäärittelyssä käytettävaksi riittävän käyttökelpoinen, koska lipoproteiinien saostamiseen tarvitaan kaksi työvaihetta (kahden eri aineen, polyetyleenimiinin ja kationinvaihtajan lisääminen, johon liittyy välissä oleva inkubointivaihe).

Tämän vuoksi on olemassa yksinkertaisen menetelmän ja reagenssin tarve, LDL-lipoproteiinien määrittystä varten, joka olisi hyvin käyttökelpoinen ja erittäin varma.

Tämä tehtävä ratkaistaan keksinnön mukaisesti menetelmän avulla, jolla voidaan määrätä pienen tiheyden omaavat lipoproteiinit (LDL) ruumiin nesteistä, ja menetelmä on tunnettu siitä, että tutkittavaan näytteeseen lisätään suuren tiheyden omaavien lipoproteiinien (HDL)-vasta-aineita, erotetaan muodostunut liukenematon sakka ja määrätään LDL tai jokin sen komponenteista sakan yläpuolella olevasta nesteestä.

Keksintö perustuu siihen yllättävään toteamiseen, että HDL vasta-aineiden avulla saostuvat kaikki LDL-määrittystä häiritsevät lipoproteiinifraktiot, itse HDL:n ohella erikoisesti VLDL ja kylomikronit, mutta LDL:ä itseään ei saada saostamalla. Tämä on erikoisesti sen vuoksi yllättävää, koska sekä HDL että myös LDL, VLDL ja kylomikronit omaavat proteiiniosan, joka sisältää samat apolipoproteiinit, vaikkakin hyvin erilaisissa konsentraatioissa. Sen vuoksi ei voitu etukäteen tietää, että HDL:n vasta-aineet saostavat kvantitatiivisesti paitsi HDL:ää myös VLDL:n ja kylomikronit

ilman että ne vaikuttaisivat tällöin LDL:ään.

VLDL:n ja kylomikronien saostumista voidaan jouduttaa lisäämällä vielä tunnettuja näiden aineiden saostusaineita.

Reagenssin yläpuolella olevaan nesteeseen jäävä LDL-fraktio voidaan sitten määrätä tavanmukaisten tässä yhteydessä käytettävien menetelmien avulla. Sen sisältämän sidotun kolesterolin määrittäminen tapahtuu etupäässä tunnettuja menetelmiä käyttäen. Siten voidaan määrittäminen suorittaa esimerkiksi saippu-
oimalla alkoholia sisältävän kalilipeän avulla ja kemiallinen määrittäminen Liebermann-Buchard'in mukaan. Parhaana pidetty on kuitenkin entsymaattinen määrittäminen käyttäen kolesterolioksidaasia ja kolesteroliolesteriä hajottavaa entsyymiä tai entsyymisysteemiä kuten erikoisesti kolesteroliolesteriä. Jälkimmäistä menetelmää käytettäessä voidaan määrätä kulu-
tettu happi, muodostunut kolestenoni tai mieluummin muodostunut H_2O_2 ammattimiehen tuntemien menetelmien mukaan. Koska ammattimiehelle on sidotun kolesterolin määrittäminen tuttua, ei tässä yhteydessä ole tarpeen puuttua siihen lähemmin. Huomattakoon kuitenkin, että keksinnön mukaisen menetelmän piirissä estetään samentumien esiintyminen poistamalla VLDL- ja kylomikronifraktiot, mitkä voisivat häiritä kolestenonin tai H_2O_2 :n optista mittaamista värireaktioiden muodossa. Menetelmä soveltuu sen vuoksi erikoisesti kolorimetrinen kolesterolin määrittämenetelmän yhteydessä.

On kuitenkin mahdollista määrätä LDL-fraktion sisältämän kolesterolin tai muiden LDL-komponenttien kuten apolipoproteiinin B, fosfolipidien ja triglyseridien asemesta itse LDL-fraktio, jolloin voidaan samaten käyttää ennestään tunnettuja menetelmiä. Mainittakoon esimerkiksi nefelometrinen määrittäminen tai DE-OS 3 007 764:ssä selostettu turbidimetrinen määrittäminen.

HDL vasta-aineita käytetään keksinnön piirissä joko HDL-antiseerumin muodossa, HDL-antiseerumin muodossa, josta on rasva poistettu, tai puhdistettujen HDL-vasta-ainefraktioiden muo-

dossa. On myös mahdollista käyttää HDL vasta-ainefragmentteja, esimerkiksi Fab, Fab₂ ja Fab'-fragmentteja. Samoin on mahdollista käyttää HDL:n apolipoproteiinien A, C ja/tai E vasta-aineita tai niiden fragmentteja. Lopuksi voidaan käyttää myös monoklonaaleja HDL-vasta-aineita.

Keksinnön mukaisesti käytettyjen vasta-aineiden valmistaminen tapahtuu käyttämällä puhdasta HDL:ää tai jotakin mainituista apolipoproteiineista immunogeeninä. Vasta-aineen valmistamista varten voidaan mainita tavanmukaisesti käytetyt eläinlajit. Parhaina pidetään lammasta ja kaniinia. Mutta paitsi jo mainittuja eläimiä tai verrattavia eliöitä voidaan vasta-aineen valmistuksessa käyttää myös soluviljelyjä.

HDL-vasta-aineita lisättäessä muodostuneet immuuniaggregaatit voidaan erottaa samaten tavanmukaisten menetelmien avulla. Kun käytetään liukoisia HDL-vasta-aineita, tapahtuu erottaminen tarkoituksen mukaisesti sentrifugoimalla. Kun käytetään immobilisoituja, kantajaan sidottuja HDL-vasta-aineita, voidaan immuuniaggregaatit erottaa yksinkertaisesti erottamalla nestefaasi kompaktista kiinteästä faasista, esimerkiksi vasta-aineilla päällystetystä kiinteästä aineesta. Jos käytetään apolipoproteiinia immunogeeninä käyttämällä saatua vasta-ainetta, on se etupäässä sellaista, jossa immunogeeninä käytetyssä apolipoproteiinissa on lipidipäällys. Tämä saadaan aikaan esimerkiksi siten, että sen jälkeen kun on apolipoproteiinit tavanmukaisesti delipidoitu ja sen jälkeen fraktioitu, valittu apolipoproteiinin A-, C- tai/ja E-fraktio lipidoidaan uudelleen. Immunogeeninä käytetään kuitenkin mieluummin puhdistettua täydellistä HDL-fraktiota. Puhdistus tapahtuu tarkoituksen mukaisesti ennestään tunnetulla tavalla eristämällä ultrasentrifugissa. Lisäksi voidaan suorittaa tarvittaessa vielä yksi puhdistus esimerkiksi immobilisoidun Concalin A:n avulla affiniteettikromatografisten tai elektroforeesimenetelmien mukaan. Ammattimies tuntee nämä menetelmät, eikä niitä ole tarpeen tässä yhteydessä selostaa lähemmin.

Keksinnön kohteena on vielä reagenssi, jonka avulla voidaan määrittää LDL-fraktio ruumiin nesteistä, tunnettu siitä, että se sisältää HDL-vasta-aineita. Parhaana pidetyssä toteutusmuodossa keksinnön mukainen reagenssi sisältää jo mainittujen HDL-vasta-aineiden tai edellä keksinnön selostuksen yhteydessä lähemmin kuvattujen fragmenttien tai vasta-aineiden tai HDL-komponenttien fragmenttien ohella vielä kolesteriinin määrittämiseen käytettävää reagenssia.

Parhaana pidetty, edellä mainitun laatuinen reagenssi sisältää kolesteriinioksidaasia, kolesteriiniestieriä hajottavaa entsyymiä tai entsyymisysteemiä, H_2O_2 :n määrittämiseen tarkoitettua systeemiä ja pinta-aktiivista ainetta.

Erään erikoisen hyvänä pidetyn suoritusmuodon mukaisesti sisältää edellä mainittu reagenssi pääasiallisesti HDL-vasta-aineita, kolesteriinioksidaasia, kolesteriiniesteraasia, peroksidaasia, 3,4-dikloorifenolia, fenolia, 4-aminofenatsonia, ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, magnesiumaspartaattia ja puskuriainetta pH-arvoa 7- 8,5 varten.

Keksinnön mukainen reagenssi sisältää vasta-aineita tarkoituksenmukaisesti konsentraatioalueella 10^{-7} - 10^{-3} mol/litra (tai kiloa kohti kiinteitä aineita) laskettuna määräysliuoksesta. Vasta-aine voi olla kiinteässä muodossa, etupäässä lyofilisoituna, tai liuoksen muodossa. Liuottimina voidaan käyttää vettä, fysiologista keittosuolaliuosta, seerumiväliainetta, puskuriainetta kuten esimerkiksi 0,01 - 0,5 m trispuskuria, pH 7-8,5 tai 0,005 - 0,1 m fosfaattipuskuria, pH 6,5 - 8,5, johon tarvittaessa voidaan lisätä esimerkiksi keittosuolaa fysiologisten keittosuolaliuosten suuruusluokkaa oleva määrä. Jos vasta-aine käytetään immobilisoidussa muodossa, ovat sopivia kantaja-aineita esimerkiksi polysakkaridit kuten selluloosa, dekstraani, tärkkelys ja sen johdannaiset, silikaatit, polyamidit, kollageeni, lateksi, alumiinioksidi, naudanseerumialbumiini ja muut sen kaltaiset kantaja-aineet. Vasta-aine voi olla myös testiastioiden, kuten muovireagenssilasien pinnalle sitoutuneena.

Reagenssi voi sisältää myös tunnettuja saostusaineita VLDL:ää ja kolymikroneja varten.

Keksinnön mukaisen menetelmän eräs oleellinen etu on siinä, että yhden ainoan reagenssin lisäyksen jälkeen voidaan näytteestä poistaa lipoproteiinilajit - paitsi LDL:ää - ja diagnostisesti tärkeä LDL-pitoisuus tai LDL-fraktion kolesteriinipitoisuus voidaan ilman näytteen lisäkäsittelyjä mitata suoraan. Edullista on myöskin se, että näytteestä poistetaan samennuksia aiheuttavat triglyseridirikkaat lipoproteiinilajit, niin että LDL-tai kolesteriininimääritystä varten on käytettävissä kirkas näyte.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä erään parhaana pidetyn toteutusmuodon perusteella.

Esimerkki 1

A) Puhdistetun HDL:n valmistaminen

Kun VLDL ja LDL on erotettu ultrasentrifugissa, eristetään tarkasti HDL-fraktio (d 1,080 - 1,210) ultrasentrifugissa, kuten on selostettu julkaisussa: V.P. Skipski: Lipid composition of lipoproteins in normal and diseased states in Blood Lipids and Lipoproteins; Quantitation, Composition and Metabolism. Julkaisija: Nelson, Wiley, New York 1972, 471-583. Fraktio sedimentoidaan tai vaahdotetaan tämän jälkeen vielä kahdesti tiheyksillä 1,080 ja 1,210.

HDL-fraktio puhdistetaan immobilisoidun Concanavalin A:n avulla (1974) Febs Lett. 91, 174-198) affiniteettikromatografisesti tai Geon-Pevicon-Block-elektroforeesin avulla R.W. Mahley'n ja K.S.Holcombe'n mukaan (1977) J.Lipid.Res. 18, 314-324, elektroforeettisesti.

B) Antiseerumin valmistaminen

Eläinlajit: lammas tai kaniini

Käytetään kohdassa A saatua immunogeeniä ja noudatetaan seuraavaa immunoimiskaavaa:

<u>Päivä</u>	<u>Antotapa</u>	<u>Immunogeenimäärä</u>
0	intradermaalisesti	1 mg proteiinia (HDL) emulgoituna Freundin apuainee- seen
7	intramuskulaarisesti	"
14	subkutaanisesti	"
30	intramuskulaarisesti	"
60	subkutaanisesti	"
edelleen joka 30. päivä	subkutaanisesti	"

Ensimmäinen näyteveren otto tapahtuu 45 päivän jälkeen.

C) 50 μ l seerumia sekoitetaan 150 μ l:n kanssa kohdassa B) valmistettua antiseerumia. Inkuboidaan 30 min huoneenlämmössä ja muodostunut sakka sentrifugoidaan pois (2 min 10.000 g).

50 μ l:aan kirkasta sakan päällä olevaa nestettä lisätään 2 ml reagenssia, joka sisältää 0,1 mol/l tris-puskuria, pH = 7,7; 0,05 mol/l magnesiumaspartaattia; 1 mmol/l 4-aminofenatsonia, 6 mmol/l fenolia, 4 mmol/l 3,4-dikloorifenolia, 0,3 % rasva-alkoholipolyglykolieetteriä, 400 U/l kolesteriiniesteraasia, 250 U/l kolesteriinioksidaasia ja 200 U/l peroksidaasia.

20 min inkubointiajan jälkeen huoneenlämmössä mitataan näytteen ekstinktio reagenssien tyhjäarvolla (reagenssien tyhjäarvo sisältää 50 μ l antiseerumia ja ottaa huomioon antiseerumin kolesteriinipitoisuuden).

$$\Delta E = \Delta E_{\text{näyte}} - \Delta E_{\text{reagenssien tyhjäarvo}}$$

$$\text{LDL-kolesteriini (mg/dl)} = 1.385 \times \Delta E$$

<u>Seerumi</u>	<u>Ulkonäkö</u>	<u>Kolesteriini</u>	<u>Triglyseridit</u>	<u>LDL-kolesteriini</u>	
				NIH-menetelmä *	Immunologinen saostus
1	samea	353 mg/dl	503 mg/dl	234 mg/dl	238 mg/dl
2	kirkas	638 mg/dl	591 mg/dl	510 mg/dl	495 mg/dl
3	kirkas	350 mg/dl	153 mg/dl	237 mg/dl	231 mg/dl
4	samea	195 mg/dl	575 mg/dl	102 mg/dl	95 mg/dl
5	sisältää kylomikroneja	231 mg/dl	379 mg/dl	149 mg/dl	130 mg/dl

*Vertailumenetelmänä käytetään NIH-menetelmää (kun VLDL ja kylomikronit on erotettu ultrasentrifugissa, saostetaan LDL. Kolesteriiniarvojen erotuksesta ennen ja jälkeen saostuksen saadaan LDL-kolesteriinin arvo).

Manual of Laboratory Operations, Lipid Research Clinics Program, Lipid and Lipoprotein Analysis, DHEW Publication N:o 65-628.

Esimerkki 2

Liuos, jossa on 50 μ l kutakin seuraavista: VLDL, HDL, LDL tai kylomikroneja, sekoitettiin 150 μ l:n kanssa kaniinin antiseerumia, jota oli tuotettu HDL:n avulla immunogeeninä. Sentrifugoitiin ja kolesteriinipitoisuus määrettiin kuten esimerkissä 1 on selostettu päällä olevasta nesteestä.

<u>Näyte</u>	<u>Näytteen kolesteriinipitoisuus</u>	
	Ennen saostamista	Saostamisen jälkeen
Kylomikroneja	61,4 mg/dl	2,6 mg/dl
VLDL	23,2 mg/dl	2,8 mg/dl
LDL	177,0 mg/dl	165,0 mg/dl
HDL	50,9 mg/dl	0,0 mg/dl

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä, jonka avulla voidaan määrätä pienen tiheyden omaavat lipoproteiinit (LDL) ruumiin nesteistä, tunnettu siitä, että lisätään tutkittavaan näytteeseen suuren tiheyden omaavien lipoproteiinien (HDL)-vasta-aineita, erotetaan muodostunut liukenematon osa ja määrätään yläpuolella olevasta nesteestä LDL tai jokin sen komponenteista.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että määrätään LDL:n komponenteista kolesteroli.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että lisätään vasta-aineita HDL-antiseerumin, HDL-seerumin muodossa, josta on rasva poistettu tai puhdistettuna vasta-ainefraktiona.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että lisätään HDL-vasta-aineiden fragmentteja.
5. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että käytetään lampaasta tai kaniinista saatuja vasta-aineita.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukaisessa menetelmässä LDL-fraktion määrittämiseksi ruumiin nesteistä käytettävä reagenssi, tunnettu siitä, että se sisältää HDL:n vasta-aineita.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen reagenssi, tunnettu siitä, että se sisältää reagenssia kolesterolin määrittystä varten.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen reagenssi, tunnettu siitä, että kolesterolin määrittämiseen käytettävä reagenssi sisältää kolesteriinioksidaasia, kolesteriiniesteriä hajotta-

vaa entsyymiä tai entsyymisysteemiä, systeemiä H_2O_2 :n määramiseksi ja pinta-aktiivista ainetta.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen reagenssi, **tunnettu** siitä, että se muodostuu pääasiallisesti HDL-vasta-aineesta, kolesteriinioksidaasista, kolesteriiniesteraasista, peroksidasista, 3,4-dikloorifenolista, fenolista, 4-aminofenatsosta, ei-ionisesta pinta-aktiivisesta aineesta, magnesium-aspartaatista ja puskurista pH-arvoa 7-8,5 varten.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 7-9 mukainen reagenssi, **tunnettu** siitä, että se sisältää HDL-vasta-aineet immobilisoidussa muodossa.

Patentkrav

1. Förfarande med vilket lågdensitetslipoproteiner (LDL) kan bestämmas i kroppsvätskor, **kännetecknat** av att i provet som skall undersökas tillsättes högdensitetslipoprotein (HDL)-antikroppar, den uppkomna olösliga delen separeras och LDL eller någon av dess komponenter bestäms i vätskan ovanför.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att av LDL:s komponenter kolesterol bestäms.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, **kännetecknat** av att antikroppar tillsättes i form av HDL-antiserum, HDL-serum från vilket fett har avlägsnats eller som renad antikroppsfraktion.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, **kännetecknat** av att fragmenter av HDL-antikroppar tillsättes.

5. Förfarande enligt något av patentkraven ovan, **kännetecknat** av att man använder antikroppar erhållna ur får eller kanin.

6. Reagens för användning vid förfarandet enligt patentkravet 1 för bestämmande av LDL-fraktion i kroppsvätskor, **kännetecknad** av att den innehåller HDL-antikroppar.

7. Reagens enligt patentkravet 6, **kännetecknad** av att den innehåller en reagens för bestämmande av kolesterol.

8. Reagens enligt patentkravet 7, **kännetecknad** av att reagensen för kolesterolbestämningen innehåller kolesteroloxidase, kolesterolinester sönderdelande enzym eller enzymsystem, ett system för bestämmande av H_2O_2 och ett ytaktivt ämne.

9. Reagens enligt patentkravet 8, **kännetecknad** av att den består huvudsakligen av HDL-antikroppar, kolesteroloxidase, kolesterolinesteras, peroxidase, 3,4-diklorfenol, fenol, 4-aminofenazon, ickejoniskt ytaktivt ämne, magnesiumaspartat och buffert för pH-värde 7-8,5.

10. Reagens enligt något av patentkraven 7-9, **kännetecknad** av att den innehåller HDL-antikroppar i immobiliserad form.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan liittotasavalta-Förbundsrepubliken Tyskland(DE) 3 009 037 (G 01 N 33/92). Iso-Britannia-Storbritannien(GB) 2 061 501 (G 01 N 33/92).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Iso-Britannia-Storbritannien(GB) 1 561 574 (G 01 N 33/68). USA(US) 4 039 285 (G 01 N 33/16).