



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 142961

(51) Int. Cl.³ C 07 G 7/00, G 01 N 33/50

(21) Patentsøknad nr. 743852

(22) Inngitt. 25.10.74

(23) Løpedag 25.10.74

- (41) Alment tilgjengelig fra 29.04.75
- (44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 11.08.80
- (30) Prioritet begjært 27.10.73, Forbundsrepublikken Tyskland,
nr. P 23 53 973
- (54) Oppfinnelsens benevnelse Steroidbindende globulin til anvendelse
ved in vitro-diagnostikk og ved frem-
stilling av antisera.
- (71)(73) Søker/Patenthaver BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT,
Marburg (Lahn),
Forbundsrepublikken Tyskland.
- (72) Oppfinner HANS BOHN, Marbach bei Marburg/Lahn,
WILHELM WINCKLER, Wenkbach,
Forbundsrepublikken Tyskland.
- (74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.
- (56) Anførte publikasjoner Norsk (NO) alment tilgjengelig søknad
nr. 1758/73, 3482/72
BRD (DE) off. skrift nr. 2221261
Chem. Abstr. 77 15797 d (1972)

Oppfinnelsen vedrører et steroid-bindende globulin til anvendelse ved in vitro-diagnostikk og ved fremstilling av antisera.

Med steroid-bindende globulin menes steroid-
5 bindende β -globulin som spesielt binder steroidhormonene testosteron og østradiol med stor affinitet.

Oppfinnelsen vedrører videre anvendelsen av det steroidbindende globulin til utvinning av antisera.

Det er kjent at blant de som β -globuliner
10 betegnede plasmaproteiner forekommer et eggehvitestoff, som har en spesiell affinitet til steroidhormoner og derfor betegnes som steroidbindende β -globulin resp. testosteron-bindende globulin. Det er allerede foreslått å isolere dette , også som β_1 AP-glykoprotein betegnede protein, fra
15 placentaer eller fra blod av svangre. (Norsk alm. tilgj. søknad 1758-73 og BRD (DE)Off.Schr. 2221261). Det er imidlertid hittil ikke lykkes å fremstille dette β -globulin i ren form. Det har spesielt den ulempe at ved utvinning av antiserum som er rettet mot dette protein, fører foruren-
20 ningene også, selvom de forekommer i små konsentrasjoner, til dannelse av antistoffer i de immuniserte dyr og betinger derved uspesifikke reaksjoner av antiseret.

Det er nå funnet et derivat av det steroid-
bindende β -globulin som oppstår ved behandling av dette
25 stoff med enzymet Neuraminidase, og som kan fremstilles i meget ren form. Dette derivat er et testosteron- eller østradiol-bindende globulin og blir i det følgende kalt "steroidbindende globulin" og tilsvarer i sine biologiske egenskaper sterkt det opprinnelige steroidbindende β -globu-
30 lin, spesielt utvinnes det fra dermed immuniserte dyr et antiserum av høy spesifitet.

Fra norsk søknad nr. 3482-72 er det kjent et glykoprotein for anvendelse til utvinning av antisera. Det dreier seg her om et β -1-glykoprotein som likeledes
35 finnes i blodserum, men imidlertid adskiller seg med dets egenskaper fra det steroidbindende globulin ifølge oppfinnelsen. Det kjente produkt har et kullhydratinnhold på

27-30%, mens produktet ifølge oppfinnelsen har et innhold på 10 resp. 12%, mens molekylvekten i det kjente produkt ligger ved ca. 100.000, ligger molekylvekten ved produktet ifølge oppfinnelsen ved 56.000 og innholdet av neuraminsyre er ved det kjente produkt 7,0-8,0%, mens ved produktet ifølge søknaden er neuraminsyreinnholdet 0,5 resp. 2,9%.

Oppfinnelsens gjenstand er følgelig et steroidbindende globulin til anvendelse ved in vitro-diagnostikk og ved fremstilling av antisera, idet globulinet er karakterisert ved at det

- a) har en spesiell affinitet til steroidhormoner,
- b) har et innhold av kullhydrater på $10,4 \pm 2,6\%$, herav $5,8 \pm 1,2\%$ heksoser, $4,0 \pm 0,8\%$ heksosamin, beregnet som N-acetylheksosamin, $0,5 \pm 0,5\%$ neuraminsyre, beregnet som N-acetyl-neuraminsyre og $0,1 \pm 0,1\%$ fukose,
- c) kan utfelles med antisera rettet mot steroidbindende β -globulin,
- d) har en elektroforetisk bevegelse tilsvarende gammaglobulinet,
- e) har en sedimentasjonskonstant på $4,1 \pm 1,0$ S, målt i fosfatpuffer ved pH 6,8,
- f) har en sedimentasjonskonstant på $1,1 \pm 0,3$ S målt i 1%-ig natriumdodecylsulfatoppløsning og
- g) har en molekylvekt på 65.000 ± 5.000 , idet det er fremstilt ved at et steroidbindende β -globulin med følgende egenskaper:
 - a) en spesiell affinitet til steroidhormoner,
 - b) et innhold av kullhydrater på $12,5 \pm 3\%$, herav $5,7 \pm 1,2\%$ heksoser, $3,9 \pm 0,8\%$ heksosamin, beregnet som N-acetylheksosamin, $2,9 \pm 0,9\%$ neuraminsyre, beregnet som N-acetyl-neuraminsyre og $0,1 \pm 0,1\%$ fukose,
 - c) utfellbarhet med spesifikke antisera,
 - d) en elektroforetisk bevegelse tilsvarende β_1 -globuliner,

- e) en sedimentasjonskonstant på $4,1 \pm 1,0$ S,
målt i fosfatpuffer ved pH 6,8,
f) en sedimentasjonskonstant på $1,1 \pm 0,3$ S målt
i 1%-ig natriumdodecylsulfatoppløsning og
g) en molekylvekt på 65.000 ± 5.000 ,

behandles med neuraminidase inntil neuraminsyreinnholdet i
proteinet er nedsatt til $0,5 \pm 0,5\%$, og deretter frem-
stilles i ren form i et rensetrinn fortrinnsvis ved ione-
utvekslingskromatografi eller elektroforese.

Oppfinnelsen vedrører også anvendelsen av
dette steroidbindende globulin til utvinning av antisera.

Det steroidbindende globulin kan fremstilles
ved at man fra kroppsvæske eller vevsekstrakter som inne-
holder dette protein i målbare konsentrasjoner, eksempelvis
fra menneskelige sera, fortrinnsvis fra blod fra svangre,
retroplasentaserum eller plasentaekstrakter isolerer
steroidbindende β -globulin, deretter behandler med neuramini-
dase og i et avsluttende rensetrinn fremstilles det i ren
form, fortrinnsvis ved kromatografi på en ioneutveksler
eller ved en tilsvarende forholdsregel, f.eks. en elektro-
forese.

Isoleringen av det steroid-bindende β -globulin
foregår ved en utvalgt kombinasjon av metoder, som på den
ene side fører til anrikning av det steroid-bindende β -glo-
bulin, på den annen side til adskillelse av dette protein
fra de øvrige plasmaproteiner. I det følgende skal det
eksempelvis påvises de muligheter som er tilstede for å opp-
nå ett for fremstilling av derivatet av steroid-bindende
 β -globulin egnet utgangsmateriale.

Til dette formål ekstraheres knuste placentaer
med vann eller en fortynnet saltoppløsning, fortrinnsvis
med ca. 0,5%-ig kokesaltoppløsning. Fra ekstraktet utvinnes
ved tilsetning av en vandig oppløsning av et vannoppløselig
derivat av en akridinbase, fortrinnsvis diaminoetoksyakrin-
dinlaktat, som tilsettes inntil en konsentrasjon på 0,25 til
0,55, fortrinnsvis på 0,4% av oppløsningen, til svakt surt
til nøytralt pH i området fra pH 5 til pH 7, fortrinnsvis

142961

4

ved pH 6, en forutfelling som ikke inneholder det ønskede protein eller bare i spor.

Deretter utfelles i alkalisk pH-område på pH 7 til pH 9, fortrinnsvis pH 8,5 fra det ovenstående fra

5 første utfelling det steroid-bindende β -globulin ved tilsetning av en vandig oppløsning av et vannoppløselig derivat av en akridinbase, fortrinnsvis igjen med diaminoetoksyakridinlaktat, som tilsettes inntil en konsentrasjon på 0,55 til 1,1%, fortrinnsvis på 0,9% av oppløsningen. Ut-

10 fellingen bringes etter dets suspensjon i vann og etterfølgende nedsettelse av pH-verdi ved hjelp av svake syrer i oppløsning og befris ved tilsetning av egnede adsorbsjonsmidler, f.eks. aktivkull, for utfellingsmidlet og fraskilles ved sentrifugering. Spesielt enkelt foregår fraskillelsen

15 av utfellingsmidlet fra proteinet ved oppslemming av utfellingen i en kloridholdig vandig oppløsning, fordelaktig i en ca. 5%-ig kokesaltoppløsning, hvorved utfellingsmidlet utfelles og deretter fjernes ved filtrering eller sentrifugering, mens proteinene går i oppløsning. For ytterligere

20 anrikning av det steroid-bindende β -globulin gjennomføres en utfelling med egnede salter, fortrinnsvis med ammoniumsulfat, således at saltets konsentrasjon fortrenger det steroid-bindende globulin fra oppløsningen. Hertil er det kjent at globulinet utfelles av ammoniumsulfat ved dets

25 metningskonsentrasjon på ca. 50%. Etter gjenoppløsning av den ved sentrifugering eller filtrering utvundne utfelling tilsettes til oppløsningen en lavere alkohol, fortrinnsvis etanol, til en konsentrasjon, hvor det steroidbindende β -globulin ennå ikke faller ut, en rekke av forurensninger kan

30 imidlertid utskilles som utfelling. Det har vist seg hensiktsmessig å tilsette ca. 25% etanol, idet etanolens tilsetning for unngåelse av denatureringsforeteelser foregår under værelsestemperatur, fortrinnsvis ved en temperatur rundt $0 \pm 4^{\circ}\text{C}$. Ved fraksjoneringsmetoder som er istand til

35 å anrike proteiner med molekylvekter mellom 50.000 og 150.000 i definert områder, kan det steroidbindende β -globulin videre-rensnes. Spesielt egnet hertil er gelfiltrering, eksempelvis

søylekromatografitrinn under anvendelse av med epiklorhydrin nettdannet dekstran, eksempelvis "Sephadex" G-150 fra firma Pharmacia, Uppsala. Gelfiltreringen kan, hvis ønsket også gjennomføres i tilknytning til en dialyse mot en fortynnet pufferoppløsning, f.eks. mot 0,01 molar tris-hydroksymetylaminoetan-saltsyre-pufferoppløsning av pH 7,5 til 8,5, fortrinnsvis pH 8,0. Til eluering kan det eksempelvis tjene 0,1 molar trishydroksymetylaminoetan-saltsyrepuffer av pH-verdi 8, som pr. liter inneholder 1 molar natriumklorid. Ved denne elueringsfremgangsmåte elueres det steroidbindende β -globulin i området av molekylvekter på ca. 100.000, hyppig umiddelbart etter 7-S-gammaglobulinet av plasmaet.

Under utnyttelse av det steroidbindende β -globulins elektriske egenskaper, lar det seg til dets rensing imidlertid også anvende elektroforese og trinn med ionevekslingsskromatografi. Det steroidbindende β -globulin adsorberes av basiske ionevexslere, eksempelvis av diaminoetyl-utvekslere på basis av nettdannet dekstran, oppnåelig i handelen som diaminoetyl-"Sephadex"- fra firmaet Pharmacia, i pH-området fra 4,5 til 9 og er å utvinne herav ved eluering med pufferoppløsningen av stigende ionestyrke. Fortrinnsvis utføres to fraksjoneringer på basiske ionevexslere, en gang ved adsorpsjon og fraksjonert eluering av det steroidbindende β -globulin ved svak sur pH-verdi, eksempelvis pH 5,0 og en annen gang i nøytralt til svakt alkalisk pH-område, eksempelvis pH 7.0.

Spesielt egnet som renseoperasjon er den preparative soneelektroforese, som viser gode resultater i kombinasjon med molekylsikt fremgangsmåten.

Også den soneelektroforetiske fremgangsmåte ved hjelp av bærestoffer gjennomføres fortrinnsvis i to forskjellige pH-områder, en gang i alkalisk pH-område, eksempelvis pH 8,6, idet sonen av β -området av plasmaproteinet utvinnes, og annen gang i svakt surt pH-område, eksempelvis pH 5, idet den tilsvarende steroidbindende β -globulinholdige sone uttas. Rekkefølgen av disse forholdsregler er

• derved ikke avgjørende.

Foretas elueringen av preoteinet fra bærematerialet fra elektroforese med en flyktig puffer, eksempelvis ammoniumhydrogenkarbonat, lar det seg direkte tilknytte
5 en frysetørkning av fremgangsmåteproduktet.

Ved anvendelse av plasma som utgangsmateriale for utvinning av steroid-bindende β -globulin kan det gåes frem nøyaktig således som ved placentaekstrakt. Det synes bare ikke nødvendig med forutfelling med akridinsalter i
10 svakt surt pH-område.

Til utvinning av derivater av det steroid-bindende β -globulin ifølge oppfinnelsen oppløses det i henhold til ovennevnte eller sammenlignbare renseoperasjoner dannede stoff i en puffer, hvis pH-verdi tilsvarer
15 de tilnærmet optimale betingelser for neuraminidase for avspaltning av neuraminsyre fra substratet ved hjelp av neuraminidase.

Det steroid-bindende β -globulins inkubasjon med neuraminidase gjennomføres så lenge inntil dette proteins
20 neuraminsyreinnhold er sunket til $0,5 \pm 0,5\%$, altså mindre enn 1%.

For behandling av det steroidbindende β -globulin er det egnet glykoprotein N-acetylneuraminyldihydrolaser, klassifisert under EC. 3.2.1.18, såkalt neuraminidase,
25 fortrinnsvis av mikrobiell opprinnelse, spesielt bakterielle neuraminidaser som de tilsvarende enzymer fra *Vibrio cholerae*, pneumokokker eller *Clostridium perfringens*. Ved anvendelse av neuraminidase fra *Vibrio cholerae* gjennomføres inkubasjonen i pH-området 5 til 7, fortrinnsvis ved pH 5,5, i en
30 i enzymologien vanlig puffer, fortrinnsvis i en pufferoppløsning av trishydroksymetylaminometan eller natriumacetat. Derved tilsettes pr. 100 mg protein 50-500 enheter neuraminidase og inkubasjonen gjennomføres i temperaturområdet $0-37^{\circ}\text{C}$,
35 fortrinnsvis 4°C eller ved værelsestemperatur på 20°C , idet 20 timer ved 4°C omtrent viser samme nedsettelse av neuraminsyreinnholdet av proteinet, nemlig til ca. 0,5%, som 5 timer ved 20°C .

Som det er kjent for enhver enzymolog gjennomføres reaksjoner av denne type under de forskjelligste betingelser, således at det også med en annen lavere konsentrasjon enn den angitte konsentrasjon av neuraminidase ved tilsvarende lengre inkubasjonstid, spesielt ved noe forhøyede temperaturer og tilsetning av aktivatorer for enzymet, kan oppnås samme effekt, nemlig fjerning av neuraminsyren fra det steroid-bindende β -globulin, med andre ord derivatet ifølge oppfinnelsen av dette protein kan fremstilles. Noen neuraminidaser aktiveres ved jordalkaliioner. Spesielt egnet for aktivering av neuraminidase fra *Vibrio cholerae* er som kjent kalsiumioner som kan tilsettes i form av vannoppløselige salter som kalsiumklorid i en konsentrasjon fra 0,1 til 1 mg/ml av inkubasjonsoppløsningen. Mengden av neuraminidasen som skal anvendes er gitt følgende definisjon av enhetene:

En neuraminidase-enhet er den mengde av enzymet som kreves til å frigjøre 1 mikrogram N-acetylneuraminsyre fra humant α_1 -glykoprotein i 0,05 molar natriumacetatpuffer av pH-verdi 5,5 med tilsetning av 9 mg/ml kokesalt og 1 mg/ml kalsiumklorid iløpet av 15 minutter ved 37°C (E. Mohr og G. Schramm, Z. Naturf. 15 b, side 568 (1960)).

Det proteinderivat som ved neuraminsyreavspaltning er blitt sterkere basisk i forhold til utgangsmaterialet, bindes mindre til basiske anionutvekslere og er derfor ved hjelp av en kromatografering på eksempelvis diaminoetylioneutveksler å befri for resterende forurensninger og også for et eventuelt ennå tilstedeværende uendret utgangsmateriale.

Ladningsegenskapene av det nyutvunnede derivat muliggjør adskillelse av forurensninger også på elektroforetisk måte. Eluatet som inneholder derivatet av det steroid-bindende β -globulin kan konsentreres, dialyseres og uten denatureringsforeteelser lyofiliseres. Det steroid-bindende globulin gir i den elektroforetiske analyse en enhetlig linje og i ultrasentrifugeanalyse et enhetlig bånd.

• Det reagerer med antiserum mot det steroid-bindende β_1 -globulin som det opprinnelige protein. Det binder som det opprinnelige protein steroider, spesielt testosteron og østradiol.

5 Det fremstilte proteinderivat har en diagnostisk betydning ved at på den ene side kan det rene antigen og på den annen side det ved immunisering med det rene antigen utvunnede spesifikke antiserum anvendes i bestem-
10 melsesmetoder for steroid-bindende β -globulin. Denne metode muliggjør å fastslå eller å forfølge forstyrrelser av steroidhusholdninger resp. endringer i innhold av det steroid-bindende β -globulin i plasma eller vev, f.eks. i løpet av sykdommer.

Oppfinnelsen skal forklares nærmere ved hjelp
15 av følgende eksempel.

Eksempel

20 Isolering av det steroidbindende β -globulin fra placenter:

10 kg menneskelig placenta knuses i dypfrossen tilstand og ekstraheres med 10 liter av en 0,5%-ig natriumkloridoppløsning (1 time ved 5°C). Alle i det følgende omtalte operasjoner gjennomføres, hvis intet annet er be-
25 merket, ved 4°C. For å holde den anvendte pufferoppløsning steril tilsettes 0,05% w/v natriumazid.

10 liter ekstraheringsoppløsning innstilles med 20%-ig eddiksyre på pH 6,0 og blandes i første rekke med 1500 ml av en 3%-ig 6,0-diamino-2-etoksyakridinlaktat-
30 oppløsning ("Akridinsaltoppløsning"). Den inaktive forutfelling fraskilles ved sentrifugering og kasseres. Den ovenstående væske innstilles med 2N natriumhydroksydoppløsning på pH 8,5 og utfelles med 3 liter akridinsaltoppløsning. Utfellingen som inneholder det steroid-bindende
35 globulin, sentrifugeres. Den flytende ovenstående væske kasseres, utfellingen suspenderes i 6 liter av en 5%-ig natriumkloridoppløsning. Etter frasentrifugeringen av den

dannede utfelling settes det til den ovenstående væske fast ammoniumsulfat til en 50%-ig metning. Derved danner det seg en utfelling som frasentrifugeres.

Den som sentrifugat dannede fuktige ammonium-sulfatholdige pasta (250 g) oppløses i 100 ml vann, dialyseres mot avionisert vann og blandes for utskillelse av en del av følgeproteinet ved pH 7,0, en elektrisk ledeevne på 10 millisiemens (innstilling med en 5%-ig koksaltoppløsning) og en temperatur på 0°C, tilsettes etanol til en konsentrasjon på 25%. Den derved dannede utfelling frasentrifugeres og kasseres; den ovenstående væske inneholder hovedmengden av det steroid-bindende β -globulin dialyseres mot vann og lyofiliseres.

Vidererensning foregår ved gelfiltrering på "Sephadex" G-150 (søyle 20 x 100cm) under anvendelse av en 0,01 molar trishydroksymetylaminoetan-HCl-puffer pH 7,0.

Påvisning av det steroidbindende β -globulin i eluatene gjennomføres immunologisk med et spesifikt antiserum i geldiffusjonsprøve. De positive fraksjoner - 1400 ml - samles og adsorberes for ytterligere kromatografisk rensning på en diaminoetyl-"Sephadex"-søyle (5x20 cm).

Elueringen av proteinet fra diaminoetyl-"Sephadex"-søylen foregår med 0,01 molar trishydroksymetylaminoetan-HCl-puffer under anvendelse av en koksaltgradient på 0-2%. Påvisningen av det steroidbindende β -globulin i eluatet utføres igjen immunologisk; de fraksjoner som inneholder det steroid-bindende β -globulin forenes (900 ml) og utfelles med 35% w/v ammoniumsulfat. Den derved dannede utfelling utvinnes ved sentrifugering og utfellingen oppløses i vann, dialyseres, først mot vann og deretter mot 0,1 molar natriumdietylbarbituratpuffer av pH 8,6. Den videre oppdeling av dialysatets proteiner i det elektriske felt foregår med den av Heide et al. (Behringwerke Mitteilung 43, side 161 ff) (1964) omtalte apparatur og metode; som inert bæremateriale tjener polyvinylklorid ("Geon" X 427), fremstilt av Goodrich Chem, Comp., Cleveland/Ohio, USA, som puffer anvendes en 0,1 molar natriumdietylbarbituratopløs-

ning (pH 8,6). Det steroid-bindende β -globulin vandrer i β_1 -sonen, elueres herav med flere ganger volumet av bærereren med 0,9%-ig koksaltoppløsning og utfelles etter fjerning av saltet ved en dialyse overfor vann med ammoniumsulfat (35% w/v). Utfellingen oppløses i 500 ml trishydroksymetylaminoetan-HCl-puffer pH 5,0 og dialyseres mot en 0,01 molar trishydroksymetylaminoetan-HCl-puffer pH 5,0. Deretter lar man oppløsningen løpe over en diaminoetyl-"Sephadex"-søyle (5 x 25 cm) som var ekvilibrert med samme puffer (pH 5,0). En del av proteinene forblir adsorbent sammen med det steroidbindende β -globulin på søylen og kan deretter elueres under anvendelse av en lineær koksaltgradient på 0-2%. Eluatene som inneholder det steroidbindende β -globulin, forenes, nøytraliseres og utfelles ved tilsetning av 40% w/v ammoniumsulfat. For den etterfølgende preparative soneelektroforese ved pH 5,0 er bærematerialet igjen "Geon" X427; som puffer anvendes en 0,15 molar natriumacetatoppløsning av pH 5,0. Det steroidbindende β -globulin vandrer ved denne pH anodisk; elueres med fysiologisk koksaltoppløsning fra den tilsvarende sone og utfelles etter oppløsningens nøytralisasjon ved tilsetning av 40% (w/v) ammoniumsulfat.

Steroidbindende β -globulin kan utvinnes på samme måte fra serum, spesielt retroplacentaserum. Hertil anvendes som utgangsmateriale for fraksjoneringen tilsvarende ovennevnte eksempel i stedet for 10 liter vevekstrakt 5 liter serum, som fortynnes med 5 liter destillert vann.

Neuraminidasebehandling av det steroidbindende β -glogulin:

For avspaltning av neuraminsyre oppløses 150 mg steroidbindende β -globulin i 30 ml 0,01 molar trishydroksymetylaminoetanpuffer ved pH 5,5, som inneholder 0,2 mg CaCl_2 pr. ml og inkuberes med 500 enheter neuraminidase fra *Vibrio cholerae* i 20 timer ved 4°C. Deretter renser man det modifiserte protein ved kromatografi på diaminoetyl-"Sephadex" (2,5 x 20 cm) under anvendelse av en 0,01 molar trishydroksymetylaminoetan-HCl-puffer av pH 5,5. Derivatet

• av det steroidbindende β -globulin vandrer derved uhindret
gjennom søylen, mens de i utgangsmaterialet ennå tilstede-
værende forurensninger forblir adsorbent. Det protein-
holdige eluat inndampes i en kolloidiumhylse (Sartorium-
5 Membranfilter-Gesellschaft), dialyseres grundig mot vann
og lyofiliseres deretter.

10

15

20

25

30

35

Patentkrav

1. Steroidbindende globulin til anvendelse ved
in vitro-diagnostikk og ved fremstilling av antisera,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t
- a) har en spesiell affinitet til steroidhormoner,
 - b) har et innhold av kullhydrater på $10,4 \pm 2,6\%$,
herav $5,8 \pm 1,2\%$ heksoser, $4,0 \pm 0,8\%$ heksosamin, beregnet
som N-acetyl-heksosamin, $0,5 \pm 0,5\%$ neuraminsyre, beregnet
10 som N-acetyl-neuraminsyre og $0,1 \pm 0,1\%$ fukose,
 - c) kan utfellesses med antisera rettet mot steroid-
bindende β -globulin,
 - d) har en elektroforetisk bevegelse tilsvarende
gammaglobulinet,
 - 15 e) har en sedimentasjonskonstant på $4,1 \pm 1,0$ S
målt i fosfatpuffer ved pH 6,8,
 - f) har en sedimentasjonskonstant på $1,1 \pm 0,3$ S
målt i 1%-ig natriumdodecylsulfatoppløsning og
 - g) har en molekylvekt på 65.000 ± 5.000 , idet det
20 er fremstilt ved at et steroidbindende β -globulin med
følgende egenskaper:
 - a) en spesiell affinitet til steroidhormoner,
 - b) et innhold av kullhydrater på $12,5 \pm 3\%$, herav
25 $5,7 \pm 1,2\%$ heksoser, $3,9 \pm 0,8\%$ heksosamin, be-
regnet som N-acetyl-heksosamin, $2,9 \pm 0,9\%$
neuraminsyre, beregnet som N-acetyl-neuraminsyre
og $0,1 \pm 0,1\%$ fukose,
 - c) utfellbarhet med spesifikke antisera,
 - d) en elektroforetisk bevegelse tilsvarende
30 β_1 -globuliner,
 - e) en sedimentasjonskonstant på $4,1 \pm 1,0$ S målt i
fosfatpuffer ved pH 6,8,
 - f) en sedimentasjonskonstant på $1,1 \pm 0,3$ S målt i
1%-ig natriumdodecylsulfatoppløsning og
 - 35 g) en molekylvekt på 65.000 ± 5.000 ,
- behandles med neuraminidase inntil neuraminsyreinnholdet i
proteinet er nedsatt til $0,5 \pm 0,5\%$, og deretter fremstilles

142961

13

• i ren form i et rensetrinn fortrinnsvis ved ioneut-
vekslingskromatografi eller elektroforese.

2. Anvendelse av det steroidbindende globulin
5 ifølge krav 1 til utvinning av antisera.

10

15

20

25

30

35