



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 166302

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl. G 01 N 33/66, C 12 Q 1/54

(83)

(21) Patentsøknad nr. **860191**
(22) Inngivelsesdag 21.01.86
(24) Løpedag 21.01.86
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 23.07.86
(44) Utlegningsdag 18.03.91
(72) Oppfinner **RAYMOND A. DWEK, Oxford,**
THOMAS W. RADEMACHER,
Oxford, England, GB

(71)(73) Søker/Patenthaver **MONSANTO COMPANY,**
800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, MO 63167, US

(74) Fullmektig **Landbergs Patentkontor A-S, Oslo.**

(30) Prioritet begjært 22.01.85, US, nr. 693075.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMANGSMÅTE FOR DIAGNOSE AV REUMATOID ARTRITT**
ELLER OSTEOARTRITT.

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for diagnose av sykdommer med et innslag av arthritt, som f.eks. reumatoid arthrititis og osteoarthritis, hvor galactosemangelen i en prøve av pasientens blodserum eller -plasma, eller leddvæske, eller en Ig-komponent eller et fragment derav, bestemmes i forhold til de tilsvarende normale verdier for galactose.

(56) Anførte publikasjoner **Mullinax, F.et.al, Arthritis and Rheumatism, Vol. 19(4), pp 813, 1976.**

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for diagnose av reumatoid artritt og osteoartritt som et eneste syndrom eller som en komponent i andre reumatiske sykdommer.

Reumatoid artritt er en svært utbredt, kronisk systemisk sykdom som antas å ha en autoimmun-bestanddel. Se f.eks. Kunkel and Tan, Adv. Immunol. 4, 351-395 (1964). Hvorvidt denne immunrespons initierer, bevarer eller er en følge av sykdommen, vet man for tiden ikke. Hittil har både humorale og cellulære mekanismer vært foreslått involvert i sykdomsutslagene i og utenfor leddene. Osteoartritt er en leddsykdom som antas å være forskjellig fra reumatoid artritt, idet benødeleggelse er et sekundært symptom etter degenerering av brusk. Denne degenerering antas å være enten en primær brusksykdom eller en sekundær respons på belastningsinduserte mikrobrudd i ben under brusk. For begge sykdommers vedkommende gjøres differensialdiagnosen for tiden på basis av klinisk bakgrunn og radiologiske kriterer.

Ved reumatoid artritt er komplekser av immunglobulin (Ig) tilstede og ligner klassiske antigen-induserte immun-komplekser når det gjelder deres evne til å aktivere klassiske komplementspor, stimulere opsoniserende aktivitet hos makrofager, fremkalle hypersensitivitet av øyeblikkelig type etter subkutan injeksjon og lignende virkninger. Disse komplekser består utelukkende av immunglobuliner, noe som innebærer at immunglobulin er både "antistoffet" (reumatoid faktor) og "antigen". Disse kompleksene adskiller seg imidlertid fra normale immunkomplekser ved bindingssetets lave affinitet (Fab-område i reumatoidfaktorer) for den antatte determinant, preferansen for homolog binding (IgG reumatoidfaktorer) og særlig ved det faktum at majoriteten av reumatoidfaktorer (IgM, IgA, IgG) bindes til immunglobulin av γ -klasse. Det har derfor vært hevdet at hos pasienter med reumatoid artritt foreligger en strukturell endring av immunglobuliner av γ -klasse (IgG) som skaper en antigen, og formodentlig immunogent aktiv sub-populasjon. Se Kunkel and Tan, supra. At denne antigene determinant faktisk eksisterer og befinner seg i C γ 2-områdene til endret IgG, er blitt fastslått på bakgrunn av den kapasitet reumatoid faktor Fab-rester har til å bindes

bare til Fc med ett av eller begge sine Cy2-områder. Denne og flere andre beviskjeder har ført til det syn at kompleksene hos pasienter med reumatoid artritt omfatter Fab-Fc (IgG)-bindinger. Det har også vært postulert at et stort antall immunkomplekser i serum fra pasienter med reumatoid artritt består overveiende, om ikke utelukkende, av selv-knyttet, endret IgG. Det vil si at de IgG-molekyler som inneholder anti-IgG-aktivitet i sitt Fab-område, også har den strukturelle abnormitet i sitt Fc-område. Det syn at denne anti-IgG-aktivitet er resultatet av et fremkalt auto-antistoff mot en abnorm IgG sub-populasjon, er imidlertid blitt imøtegått av andre forskere som presenterte data som antydte at selv-bindingen av IgG ikke var følgen av egentlige bindinger mellom antistoff og antigen (ikke et autoimmunfenomen).

Forsøk på å undersøke de molekylære endringer i Fc-området som forårsaker disse fenomenene, har i store trekk omfattet bruken av reumatoidfaktorer som de mest spesifikke tilgjengelige prøber. IgG og IgM reumatoidfaktorer oppviser imidlertid to forvirrende egenskaper. For det første reagerer de i stor utstrekning ikke bare med IgG fra det samme (syke) individ, men også med IgG fra friske individer og til og med andre arter (f.eks. kanin, rhesus-ape). Dette betyr at Fc-bindingssettet på noen av IgG-ene fra pasienter med reumatoid artritt også finnes på IgG erholdt fra pasienter uten sykdom, men antagelig i en latent form. For det andre bindes hos noen pasienter anti-IgG med en stor andel (25%) av den totale mengde IgG, og de resulterende kompleksene utgjør over 50%. For det tredje er bindinger mellom reumatoid faktor og IgG utelukkende monovalente, til tross for det vanlige syn at IgG er et strukturelt symmetrisk molekyl og derfor alltid burde ha et liketall med determinanter. Selv om steriske hindringer etter bindingen mellom reumatoid faktor og mål-IgG kan tilskrives denne monovalenthet, er det mulig at glycosylering av IgG faktisk gjør mange molekyler strukturelt asymmetriske (selv om de fortsatt faktisk er symmetriske når det gjelder polypeptidene). Dersom det sistnevnte var tilfellet, kunne den antigene determinant på Fc omfatte oligosaccharid på visse måter.

Det er ingen bevis som taler for aminosyreendringer i

Fc-området til IgG fra pasienter med artritt. I flere rapporter er det imidlertid foreslått at total serum-IgG eller IgG-reumatoid faktor fra pasienter med immunkomplekssykdommer (reumatoid artritt, systemisk lupus erythematosus) er unormal når det gjelder carbohydratinhold. Se Pope et al., J. Immunol. 115, 365-373 (1975), Hymes et al., J. Biol. Chem. 254, 3148-3151 (1979) og Duc Dodon et al., Immunol. 42, 401-407 (1981).

Det fremgår ikke av disse publikasjoner hvordan immunkompleks-abnormiteten kan brukes, dersom den i det hele tatt kan brukes, i diagnostisk metodikk for reumatoid artritt. Vanlig brukte fremgangsmåter for diagnose av reumatoid artritt er basert på serologiske reaksjoner. Ved disse prøvene omsettes pasientens serum med en rekke forskjellige serologiske blandinger hvorav alle inneholder gammaglobulin i en eller annen form eller en bestanddel av "Cohn Fraction II" erholdt fra plasma eller serum, som stort sett består av gammaglobulin. Dersom pasientens serum er positivt med hensyn til sykdommen, vil tilstedeværelsen av den såkalte reumatoide faktor forårsake en agglutinasjons- eller immunutfellingsreaksjon som kan sammenlignes med kontrollprøver. Slike reaksjoner kan bestemmes ved hjelp av forskjellige velkjente, definitive tester som omfatter f.eks. elektroforese, Coombs' (antiglobulin) hemagglutinasjon inhiberingstest, precipitinreaksjon, geldiffusjon, immunelektroforese, nefelometri, radioimmunologisk kvantifisering og strømnings-cytometri.

En typisk bestanddel i agglutinasjonsprøven for reumatoid faktor omfatter bruken av inerte bærerpartikler, som f.eks. latekspartikler. Denne prøven ble først beskrevet av Singer and Plotz, Amer. J. Med. 21, 888-892 (1956). Modifikasjoner av latekstesten er beskrevet i US patentskrift nr. 3 088 875 og en rekke andre patentskrifter og publikasjoner. Kommersielle eksempler på disse latekstestene for reumatoid faktor er "Rapi-tex", "RA-TEST" og "RHEUMANOSTICON".

Ytterligere bakgrunnsinformasjon vedrørende disse konvensjonelle diagnostiske tester for reumatoid artritt kan fåes i Rose og Friedman, Manual of Clinical Immunology,

American Society For Microbiology, Washington, D.C., andre utgave, 1980. Se spesielt Horan og Schenk, "Flow Cytometric Analysis of Serum Autoantibodies Applied to the Detection of Rheumatoid Factor", kapittel 9, s. 56-58, Agnello, "Method for Detection of Immune Complexes Utilizing Clq or Rheumatoid Factors", kapittel 21, s. 178-185, og Froelich og Williams, "Tests for Detection of Rheumatoid Factors", kapittel 117, s. 871-873. See også Schur, "Immune-complex assays: The state of the art", New England Journal of Med. 298 (3), 161-162 (1978).

Til tross for den vesentlige mengde vitenskapelig viten innen området, er det åpenbart at ingen diagnostisk test for reumatoid artritt er fullt pålitelig. En betydelig prosentdel av klassiske pasienter med sykdommen mangler den reumatoide faktor. Følgelig ville en forbedret fremgangsmåte for diagnose av reumatoide sykdommer og beslektede tilstander ha betydelig anvendelse.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for diagnose av reumatoid artritt og osteoartritt som et eneste syndrom eller som en komponent i andre reumatiske sykdommer. En reduksjon i ytterarmgalactosylering i en IgG-komponent eller et fragment derav på 34-59 % i en pasients blodserum eller plasma eller leddvæske bestemmes ved å analysere med hensyn på forekomsten av ikke-reduserende, terminale ytterarm-N-acetylglucosaminrester i IgG-komponenten eller fragmentet ved direkte kjemiske, enzymatiske eller lectinbaserte prøver på eksponert N-acetylglucosamin eller indirekte ved bestemmelse av f.eks. endringer i molekylvekt eller hydrodynamisk volum og sammenligne med tilsvarende normale kontrollverdier. Prøvene utføres på hel Ig som f.eks. IgG, eller et fragment derav. Fragmenter kan f.eks. være H-kjede, Fc eller glycopeptider, eller intakte Ig-oligosaccharider eller oligosaccharidfragmenter avledet fra Ig.

Illustrerende eksempler på utførelse av den ovenfor angitte bestemmelse ved direkte kjemiske, enzymatiske eller lectinbaserte prøver på eksponert N-acetylglucosamin:

(i) direkte enzymatiske prøver på β -N-acetylglucosamin som omfatter bruk av $\text{exo-}\beta$ -N-acetylhexosaminidaser, og

(ii) direkte lectin-prøver på β -N-acetyl-hexosamin som omfatter bruk av agglutinin fra hvetespire.

Oppfinnelsen kan som nevnt også utføres ved hjelp av indirekte fremgangsmåter som f.eks. bestemmelse av endringer i molekylvekt eller hydrodynamisk volum. Det vil si at bestemmelsen kan omfatte den fullstendige sekvensbestemmelse av alle komplekse oligosaccharider i Ig eller ethvert av dets ovenfor angitte fragmenter, analyse av profilene til asialofraksjonen eller den nøytrale oligosaccharidfraksjonen av Ig, eller endringer i molekylvekten til glycopeptider fra Ig og dets fragmenter.

Ifølge oppfinnelsen er det funnet at:

1. Omfanget av ytterarm-galactose- β -(1-4) på serum IgG avtar til 50% ($p = 0,001$) i "asialo"-oligosaccharidfraksjonen ved reumatoid artritt og 41% ($p = 0,001$) i den nøytrale oligosaccharidfraksjon ved reumatoid artritt. Det er en resiprok økning i innholdet av ikke-reduserende N-acetylglucosamin bundet terminalt til ytterarm- β -(1-2).

2. Omfanget av ytterarm-galactose avtar til 66% ($p = 0,002$) i "asialo"-fraksjonen ved osteoartritt og 59% ($p = 0,002$) i den nøytrale oligosaccharidfraksjon ved osteoartritt. Det er en resiprok økning i ikke-reduserende ytterarm-N-acetylglucosamin bundet terminalt til β -(1-2).

Selv om beskrivelsen avsluttes med krav som særlig er rettet mot og klart krever den gjenstanden som ansees for å utgjøre foreliggende oppfinnelse, antas det at oppfinnelsen vil bli bedre forstått ut fra den følgende beskrivelse sett i sammenheng med de ledsagende tegninger hvor, i korte trekk:

Fig. 1(a) viser strukturen til antistoffmolekylet (IgG) i skjematisk diagramform.

Fig. 1(b) viser den relative størrelse av et immunglobulinområde og et fullstendig utstruktet N-bundet komplekst oligosaccharid.

Fig. 2 viser diagramatisk de primære sekvensene i de N-bundne oligosaccharider som er tilknyttet human-IgG. Det hydrodynamiske volum (målt i glucoseenheter - g.u.) for hver struktur (eller for dens nøytrale derivat i tilfellet med de

166302

6

som er sialylert) er angitt. Nøkkelen til diagramsymbolene er vist i rammen nederst. Den sammensatte struktur er også vist av Rademacher et al., Biochem. Soc. Trans, 11, 132-
5 134 (1983).

Fig. 3 viser representative Bio-Gel P-4 (-400)gel-permeasjonskromatogrammer for asialo-oligosaccharidene i det samlede serum-IgG for (a) kontroll-, (b) reumatoid artritt- og (c) osteoartritt-pasienter.

10 Fig. 4 viser den relative opptreden av de fire kjernestrukturene i asialo-oligosaccharidene fra det samlede serum-IgG for kontroll-, reumatoid artritt- og osteoartritt-pasienter i to undersøkelsesserier.

Fig. 5 viser representative radioelektroforetogrammer
15 av oligosaccharidene frigjort fra IgG fra kontroll-, reumatoid artritt- og osteoartritt-pasienter.

I eksemplene nedenunder er det brukt vanlige carbohydrateforkortelser og -nomenklatur. Følgende symboler er således brukt for å angi monosaccharideneheter og deres rester
20 i oligosaccharider:

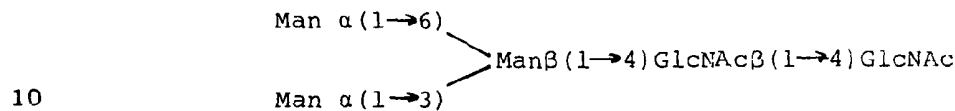
Glucose	-	Glc
Galactose	-	Gal
Mannose	-	Man
25 Fucose	-	Fuc

Glyconsyrer, glycuronsyrer,
2-amino-2-deoxysaccharider og N-acetyl-derivater derav er betegnet med modifiserte symboler. F.eks.:
30

N-acetylglucosamin	-	GlcNAc
N-acetylneuraminsyre	-	NeuNAc

35

- Posisjonen til og typen av bindinger mellom enheter er vist ved hjelp av tall og de anomere symboler α og β . Piler er brukt for å angi retningen på glycosidbindingen, idet pilen peker bort fra bindingens hemiacetalcarbonatom. F.eks. kan en vanlig forgrenet kjerne i oligosaccharider med N-glycosidiske proteinbindinger angis på følgende måte:



Aminosyrer er også angitt ved de vanlige brukte symboler. F.eks.:

15

L-asparagin	-	Asn
L-serin	-	Ser
L-threonin	-	Thr

- På samme måte er antistoffstruktur betegnet ved hjelp av konvensjonell nomenklatur. Molekyler av immunglobulin (Ig) er bygd opp av lette (L) og tunge (H) kjeder. Hver av de fem typene Ig-molekyler har like sett av lette kjeder, men et antigent forskjellig sett av tunge kjeder navngitt med den tilsvarende greske bokstav (γ -kjeder i IgG, μ i IgM, α i IgA, δ i IgD, ϵ i IgE). Aminosyresekvensen til de N-terminale homologienheter varierer i stor grad mellom molekyler og er kjent som det variable område (V) til forskjell fra det konstante område (C) i molekylerne. De N-terminale homologienheter i lette og tunge kjeder er betegnet henholdsvis V_L og V_H . Fragmenter av antistoffmolekylet erholdt ved hjelp av papainspalting betegnes de antigenbindende fragmenter (Fab) og det krystalliserbare fragment (Fc), mens fragmenter erholdt etter pepsinspalting og som er lite forskjellige, er kalt Fab' (univalent fragment) og F(ab')₂ (bivalent fragment).

- 35 For å illustrere oppfinnelsen, ble glycosyleringssporet til samlet IgG isolert fra artritt-pasienter undersøkt nærmere. Dette ble påbegynt av oppfinnerne i Oxford, Storbritannia, og deretter gjort i samarbeidsundersøkelser utført samtidig i Oxford, Storbritannia, og Tokyo, Japan, hvor de N-bundne oligosaccharider i samlet serum-IgG fra forskjellige individer

ble analysert. Ved begge undersøkelsene ble tre grupper indivi-
vider sammenlignet - normale kontrollindivider, osteoartritt-
individer og reumatoid artritt-individer. Resultatene, som
krevde en evaluering av over 1200 primære oligosaccharidsek-
5 venser fra 42 IgG-prøver, indikerer at sykdomstilstanden
reumatoid artritt korrelerer med en markert endring i om-
fanget av galactosylering av oligosaccharidsekvensene som er
karakteristisk for human-IgG. Dertil oppviser samlet serum-IgG
fra pasienter med osteoartritt den samme mangeltype ved et
10 nivå som ligger mellom den normale og den rheumatoide tilstand.
Viktig er det at mangelen ikke ved noen av sykdommene fører
til nye oligosaccharidstrukturer, men heller til en endring i
de relative molare forhold mellom de normalt forekommende
strukturer.

15

Eksempel 1

Asparaginbundne IgG-oligosaccharider

Human serum-IgG er et glycoprotein som inneholder gjennom-
snittlig 2,8 N-bundne oligosaccharider pr. molekyl. Se Rade-
20 macher og Dwek, Prog Immunology 5, 95-112 (1983). Disse er
fordelt ikke-tilfeldig mellom de to bevarte glycosylerings-
seter i Fc-området (Asn 297), og de variable glycosylerings-
seter i Fab-området. Se Sox og Hood, Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 66, 975-982 (1970) og Spiegelberg et al., Biochemistry 9,
25 4217-4223 (1970). Paringen av oligosaccharidene i mellomrommet
mellom Cy2-områdene omfatter ofte oligosaccharider med for-
skjellig primærsekvens. Se Sutton og Phillips, Biochem. Soc.
Trans. 11, 130-132 (1983). Følgelig er det adskilte undersøkt
av asymmetriske IgG-molekyler innenfor den totale IgG-popula-
30 sjon. Det ovenfor nevnte er illustrert ved hjelp av fig. 1(a)
på følgende måte:

Figur 1(a)

Antistoffmolekylet består av to tunge (H) og to lette
35 (L) kjeder bundet sammen ved hjelp av disulfidbruer (heltrukne
streker) og er delt opp i homologe sekvensområder (V_H , C_H^1 ,
 C_H^2 , C_H^3), som alle har en intrakjede-disulfidbrue. (Det
mønster for interkjede-disulfidbrudannelse som her er vist,
er karakteristisk for human subklasse IgG1). I V_H og V_L angir

de prikkede deler sekvensens hypervariable områder som, i den tredimensjonale struktur, sammen danner antigenbindingssetet. De bevarte asparagin-bundne, dobbeltantenneformede, komplekse oligosaccharidkjeder er bundet til Asn 297 i C_H2-områdene.

6 Se Sutton og Phillips, supra. Ikke-bevarte bindings seter for oligosaccharid finnes i Fab-området. Hyppigheten og lokaliseringen av disse er avhengig av tilstedeværelsen av Asn-X-Ser-seter i de hypervariable områdene. Se Sox og Hood, supra.

10 De relative størrelser av et immunglobulinområde og et fullstendig utstrakt N-bundet komplekst oligosaccharid er svært like som vist i fig. 1(b). Se også Montreuil, Biochem. Soc. Trans. 11, 134-136 (1983). Posisjonen til det bevarte oligosaccharid på C_H2-området er angitt i fig. 1(b). Se også Spiegelberg et al., Biochemistry 9, 4217-4223 (1970). Når
15 det gjelder struktur- og konformasjonsanalyse av immunglobulin-avlede N-bundne oligosaccharider, se også Rademacher et al., Biochem. Soc. Trans. 11, 132-134 (1983) og Rademacher og Dwek, Prog. Immunol. 5, 95-112 (1983).

20 Det er blitt isolert minst 30 forskjellige dobbeltantenneformede oligosaccharider av komplekstype fra IgG fra humanserum. Disse er illustrert i fig. 2. For å sammenligne de molare andeler av hver av disse strukturene, ble hver prøve av IgG fra totalserum utsatt for hydrazinolyse for å frigjøre oligosaccharidrestene i intakt form ifølge fremgangs-
25 måten til Takasaki et al., Methods in Enzymology 83, 263-268, Academic Press, 1982. Deretter ble reduksjon av de reducerende, terminale N-acetylglucosaminrester med NaB³H₄ utført for å merke hver carbohydratkjede radioaktivt. Deretter ble hver merket oligosaccharidblanding utsatt for grundig
30 neuraminidasespalting for å analysere fordelingen av nøytrale strukturer. Disse "asialo" oligosaccharidblandinger ble så utsatt for gelgjennomtrengningskromatografi på Bio-Gel[®] P-4 (-400 mesh), en teknikk som fraskiller nøytrale oligosaccharider kun på basis av de effektive hydrodynamiske volumer til disse,
35 som beskrevet av Yamashita et al., Methods in Enzymology 83, 105-126, Academic Press, 1982. Bio-Gel[®] P-4 er en kommersielt tilgjengelig porøs polyacrylamidkuleharpiks for gelfiltrering med høy oppløsning fremstilt ved copolymerisering av

- acrylamid og N,N'-methylen-bis-acrylamid. Se Hjertem og Mosbach, Anal. Biochem. 3, 109 (1962). Andre egnede kromatografiske medier ved gelgjennomtrengning for separering av oligosaccharider etter størrelse er f.eks. agarosegeler og
- 5 Sephadex[®]-geler (kryssbundet dextran).

Den detaljerte fremgangsmåte for utførelse av den ovenfor nevnte hydrazinolyse og gelgjennomtrengningskromatografi var som følger: IgG fra serumet til hver av 42 individer ble isolert ved utfelling ved 4°C med ammoniumsulfat (33%) og

10 DE-52 ionebytterkromatografi (4°C) i 0,01 M H₂HPO₄, pH 7,2. DE-52 er en kommersielt tilgjengelig diethylaminoethyl-derivatisert ionebyttercellulose i en mikrogranulær form. Hvert rensert IgG (5 mg) ble dialysert grundig mot destillert vann (4°C) og ble frystørket over aktivert trekull ved -196°C

15 (<10⁻⁶ torr). Proteinprøver ble oppslemmet i nydestillert, vannfri hydrazin i 8 timer ved 100°C under en vannfri argonatmosfære. Hydrazinet ble fjernet ved gjentatt (5x) hurtiginndamping fra vannfri toluen. Hydrazinolysatene ble N-acetyleret ved tilsetning av et overskudd eddiksyreanhydrid i mettet

20 NaHCO₃ ved 4°C. Etter passering gjennom en kolonne med kommersielt tilgjengelig Dowex[®] Ag 50 x 12 (H⁺-form) ionebytterharpiks for å fjerne Na⁺, ble prøvene inndampet til tørrhet (27°C), oppløst på nytt i vann og påført Whatman 3 MM kromatografipapir. Nedstrømmende papirkromatografi (27°C) ble

25 deretter utført ved å bruke n-butanol:ethanol:vann (4:1:1 v/v) (oppløsningsmiddel I). Etter 48 timer ble de første 5 cm eluert med H₂O. De således isolerte oligosaccharider ble hurtig inndampet til tørrhet (27°C) og redusert med et 5 gangers overskudd av NaB³H₄ (7,6 Ci mmol⁻¹, New England Nuclear)

30 i 50 mM NaOH, pH 12,0, 30°C i 4 timer. Et ekvivalent volum av 1 M NaB¹H₄ i 50 mM NaOH, pH 12,0, ble deretter tilsatt og inkubasjon fortsatt i 2 timer. Blandingen ble så surgjort (pH 5-6) med 1 M eddiksyre og sendt gjennom en Dowex[®] 50 x 12 (H⁺) kolonne, inndampet til tørrhet (27°C) og hurtiginndampet

35 (5X) (27°C) fra methanol. Prøvene ble så påført Whatman 3 MM papir og utsatt for nedstrømmende papirkromatografi i 2 dager i oppløsningsmiddel II. Radiokromatogramscanning ble utført med en Berthold radiokromatogram-scanner LB280. Deretter ble radioaktiviteten ved startstedet eluert med vann. En aliquot

av således isolerte, reduserte [³H]-oligosaccharider ble deretter utsatt for en grundig neuraminidasespalting (Arthobacter ureafaciens, Nakrai Chemical Co., Kyoto, Japan); radioaktivt sukker (1×10^7 cpm) i 50 μ l 0,1 M natriumacetat, pH 5,0), som inneholdt 0,1 enzymenheter. Inkubasjon ble utført ved 37°C i 18 timer under en toluenatmosfære. Prøvene ble så utsatt for høyspenningspapirelektroforese ved 80 V/cm i pyridin/eddiksyre/vann 3:1:387 volum/volum, (pH 5,4). All radioaktivitet ble tilbake ved startstedet og bekreftet derved den fullstendige spalting av N-acetylneuraminsyre. Prøvene ble utvunnet fra papir ved eluering med vann, avsaltet ved å bruke en dobbeltvirkende kolonne av Dowex[®] AG 50 x 12 (H⁺) og AG 3 x 4A (OH⁻) i vann, inndampet til tørrhet, oppslemmet på nytt i 175 μ l av et 20 mg ml⁻¹ partielt dextransyrehydrolysat og påført en Bio-Gel[®] P-4 (-400 mesh) gelgjennomtrengningskromatografikolonne (1,5 cm x 200 cm). Kolonnen ble holdt ved 55°C og vann (ved 200 μ l/minutt) ble brukt som elueringsmiddel. Elueringsmidlet ble overvåket med hensyn på radioaktivitet ved å bruke en Berthold HPLC radioaktivitetsmonitor (modell LB503), og med hensyn på brytningsindeks ved å bruke et Perkin Elmer modell LC25 refraktometer. Analoge signaler fra monitorene ble digitalisert ved å bruke Nelson analytiske ADC-tilpasningsenheter. De digitale verdier ble samlet opp og analysert ved å bruke Hewlett Packard 9836 C datamaskiner. Fig. 3 viser radioaktivitet (vertikal akse) plottet mot retensjonstid etter fjerning av st. kastisk støy ved å bruke Fourier transformasjonsteknikker. De tallene som er skrevet over sporet henviser til elueringsposisjonen for glucoseoligomerer i glucoseenheter (g.u.) slik de samtidig ble bestemt ved hjelp av monitoren for brytningsindeks. Vo er den "tomme" posisjon. Prøveelueringsposisjoner (i g.u.) ble beregnet ved hjelp av "spline" interpolasjon i tredjegrads kurve mellom de indre standardposisjoner for glucoseoligomerer. Innføyelsene er av oppløsningsøkte profiler tegnet med aksene for retensjonstid uendret og radioaktivitetsaksen redusert med 0,5. Oppløsningsøkning ble oppnådd ved hjelp av linjeformet transformasjon i Fourier-planet.

En sammenligning av de individuelle profiler oppnådd avslører flere interessante poenger.

For det første var alle asialo P-4 kromatogrammer fra kontrollindividene (fig. 3a) i det vesentlige identiske. Det betyr at selv om ethvert gitt IgG-molekyl kan inneholde bare et svært lite antall bestemte oligosaccharidstrukturer (dvs. 2 pr. Fc og i tillegg Fab-sukkeret), er det totale relative molarbidrag fra hvert av de ca. 30 strukturer i analysen av polyklonal IgG bemerkelsesverdig konstant. Dette store antall oligosaccharidsekvenser er ikke resultatet av at analysen ble utført på polyklonalt IgG ettersom dette samme "sett" av strukturer gjenfinnes både på myelomproteiner på mennesker og monoklonale antistoffer fra mus. For det andre er asialo P-4 kromatogrammene fra pasienter med reumatoid artritt i det vesentlige de samme fra en pasient til en annen, men adskiller seg betydelig og diagnostisk fra kontrollprofiler (fig. 3b). For det tredje er asialo oligosaccharid P-4 kromatogrammene fra pasienter med osteoartritt også karakteristiske for alle slike pasienter og er forskjellig fra både profilen for kontrollen og reumatoid artritt (fig. 3c). For det fjerde og aller viktigste, kan forskjellene mellom de karakteristiske profilene for kontroll og artritt (osteoartritt og reumatoid) asialo P-4 gjøres rasjonalt uttrykt som en populasjonsforskyvning mot oligosaccharidstrukturer med lavere hydrodynamisk volum. For å fastslå den molekylære basis for denne forskyvningen, ble asialo-oligosaccharidene fra hver pasient analysert med hensyn på enten (1) de relative nivåer av forskjellige kjerneenheter, og (2) graden og typen av ytterarmsubstitusjoner.

Eksempel 2





30 Oligosaccharidkjerner

Generelt kan N-bundne oligosaccharider av kompleks type klassifiseres som inneholdende en av fire forskjellige kjernestrukturer som er illustrert i diagramform i fig. 4. Se Mizuochi et al., J. Immunol. 129, 2016-2020 (1982). For de dobbeltantenneformede oligosaccharider av IgG kan de relative andeler av disse fire kjerner lett bestemmes ved spalting av den samlede mengde oligosaccharider med en blanding av Streptococcus pneumoniae β -galactosidase og β -N-acetyl-hexosaminidase

som beskrevet av Mizuochi et al., supra. De resulterende spaltingsprodukter er diagnostiske for hver av de fire kjerner og adskiller seg tilstrekkelig i hydrodynamisk volum til å kunne oppløses på en P-4 kolonne. Resultatene oppsummert i fig. 4 indikerer klart at det ikke er noen systematisk korrelasjon mellom sykdomstilstand og forekomsten av noen bestemt type kjernestruktur.

Den detaljerte fremgangsmåte for bestemmelse av de relative forekomster av de fire kjernestrukturer var som følger:

- 10 En aliquot ($3 - 5 \times 10^5$ cpm) av de ikke-fraksjonerte asialo-oligosaccharider ble spaltet med en blanding av Strep. pneum. β -galactosidase (2 millienheter) og β -N-acetylhexosaminidase (4 millienheter) i 25 μ l 0,1 M citratfosfat, pH 6.0. Spaltingen ble utført ved 37°C i 18 timer under en toluenatmosfære og
- 15 avsluttet ved oppvarming til 100°C i 2 minutter. Etter avsalting [med Dowex [®] Ag 50 x 12 (H⁺), Ag3.4A (OH⁻)] ble spaltingsproduktene separert på en Bio-Gel [®] P-4 (-400 mesh) kolonne. Enzymer ble rensert ved hjelp av en modifikasjon av fremgangsmåten ifølge Glasgow et al., J. Biol. Chem. 252, 20. 8615-8623 (1977). Strep. pneum. β -galactosidase fjerner alle galactoserester fra asialo-oligosaccharidene i IgG, uansett kjernestruktur. Strep. pneum. β -N-acetylhexosaminidase spalter de resulterende oligosaccharider på en måte som er avhengig av nærværet av den (halverende) GlcNAc β 1 \rightarrow 4 rest.
- 25 Nærmere bestemt frigjøres bare en N-acetylglucosaminrest (GlcNAc 5 i fig. 2) fra agalactosylstrukturen GlcNAc β 1 \rightarrow 2 Man α 1 \rightarrow 6 (GlcNAc β 1 \rightarrow 2 Man α 1 \rightarrow 3) (GlcNAc β 1 \rightarrow 4) Man β 1 \rightarrow 4 GlcNAc β 1 \rightarrow 4 (\pm Fuc α 1 \rightarrow 6) GlcNAc som omdannes til GlcNAc β 1 \rightarrow 2 Man α 1 \rightarrow 6 (Man α 1 \rightarrow 3) (GlcNAc β 1 \rightarrow 4) Man β 1 \rightarrow 4 GlcNAc β 1 \rightarrow 4 (\pm Fuc α 1 \rightarrow 6) GlcNAc. To N-acetylglucosaminrester frigjøres imidlertid fra GlcNAc β 1 \rightarrow 2 Man α 1 \rightarrow 6 (GlcNAc β 1 \rightarrow 2 Man α 1 \rightarrow 3) Man β 1 \rightarrow 4 GlcNAc β 1 \rightarrow 4 (\pm Fuc α 1 \rightarrow 6) GlcNAc, som omdannes til Man α 1 \rightarrow 6 (Man α 1 \rightarrow 3) Man β 1 \rightarrow 4 GlcNAc β 1 \rightarrow 4 (\pm Fuc α 1 \rightarrow 6) GlcNAc. De fire kjernene har følgende strukturer:

- A ()Man α 1 \rightarrow 6 (Man α 1 \rightarrow 3) (GlcNAc β 1 \rightarrow 4) Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc(+B-F);
- B ()Man α 1 \rightarrow 6 (Man α 1 \rightarrow 3) Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc(-B-F);
- 5 C ()Man α 1 \rightarrow 6 (Man α 1 \rightarrow 3) (GlcNAc β 1 \rightarrow 4) Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4(Fuc α 1 \rightarrow 6)GlcNAc(+B+F);
- D ()Man α 1 \rightarrow 6 (Man α 1 \rightarrow 3) Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4(Fuc α 1 \rightarrow 6)GlcNAc(-B+F).

Den prosentvise andel av hver kjerne bestemt i Oxford-seriene var: (+B-F)-kontroll (5,1 \pm 3,3) OA (3,5 \pm 1,0), RA (4,1 \pm 1,4); (-B-F)-kontroll (19,1 \pm 6,7), OA (13,5 \pm 5,1), RA (16,9 \pm 5,9); (+B+F)-kontroll (10,7 \pm 6,0), OA (13,0 \pm 6,5), RA (10,2 \pm 3,1); (-B+F)-kontroll (65,1 \pm 1,3), OA (69,7 \pm 8,0), RA (70,5 \pm 5,8). Verdiene bestemt i Tokyo-seriene var: (+B-F)-kontroll (3,1 \pm 0,7), OA (3,7 \pm 0,8), RA (4,6 \pm 1,4); (-B-F)-kontroll (9,9 \pm 3,0), OA (9,7 \pm 2,4), RA (8,8 \pm 2,1); (+B+F)-kontroll (15,4 \pm 0,9), OA 16,6 \pm 4,0), RA (20,9 \pm 5,7); (-B+F)-kontroll 71,7 \pm 2,8), OA (70,1 \pm 5,1), RA (65,7 \pm 6,7). Det er ingen statistisk signifikans ($p > 0,05$) for den forskjellige forekomsten av hvilke som helst av kjernene i de tre gruppene.

Ovenfor er: B = halverende GlcNAc; F = fucose.

Eksempel 3

Ytterarm-substitusjoner

25 Ytterarmstrukturene kan karakteriseres med hensyn til forekomsten, bindingen og lokaliseringen av galactose, N-acetylglucosamin og N-acetylneuraminsyre. Asialo-oligosaccharidblandingene ble derfor først utsatt for Ricinus communis agarose affinitetskromatografi for å adskille galactosylerte og ikke-galactosylerte strukturer. Tabell 1 nedenunder viser at 30 75% av alle oligosaccharidkjeder i IgG fra kontroll inneholder minst én galactoserest. I IgG isolert fra pasienter med reumatoid artritt og osteoartritt inneholdt bare henholdsvis 50% ($p = 0,001$) og 66% ($p = 0,002$) galactose.

35 For å undersøke denne galactosemangel nærmere, ble forholdet mellom digalactosyl- og monogalactosylstrukturer bestemt i hvert enkelt tilfelle, enten ved hjelp av kromatografi av de galactosylerte oligosaccharidkjeder på Ricinus

communis agarose , eller enzymatisk. I det sistnevnte tilfelle resulterte spalting med β -N-acetyl-hexosaminidase fra jacktre-bønne etterfulgt av P-4 gelgjennomtrengningskromatografi i oppløsningen av fragmenter som er diagnostiske for de digalactosylerte og monogalactosylerte strukturer. For holdene mellom digalactosyl- og monogalactosylstrukturene som ble oppnådd ved begge fremgangsmåter, var sammenfallende og indikerte en reduksjon på 28% ($p < 0,02$) og 14% ($p < 0,15$) i asialo oligosaccharidblandingen fra pasienter med henholdsvis reumatoid artritt og osteoartritt.

For å bestemme om det reduserte antall kjeder som inneholder galactose var sekundær i forhold til en reduksjon i ytterarm $\beta(1-2)$ -bundne N-acetyl-glucosaminrester, ble de ikke-galactosylerte strukturer fra hvert individ utsatt for P-4 kromatografi. I alle tre grupper ble det funnet like profiler, noe som medfører at det ikke er noe underskudd på N-acetylglucosamin-rester $\beta(1-2)$ -bundet til ytterarm (GlcNAc 5 og 5'). Dette ble deretter bekreftet enzymatisk. Det kan derfor ikke være noen forskjeller mellom individer, uansett deres sykdomstilstand, når det gjelder utstrekningen av N-acetylglucosaminylering.

Etttersom de negative ladete N-acetyl-neuraminsyrerester gir mobilitet i et elektrisk felt, ble en aliquot av den merkede oligosaccharidblanding (før neuaraminidasespalting) utsatt for høyspenningspapirelektroforese. Oligosaccharidene ble fullstendig separert i nøytrale, monosialylerte og disialylerte strukturer (fig. 5). Forekomsten av disse er gjengitt i tabell 2 nedenunder, og de strukturer som er tilstede i de tre grupper er nærmere angitt i fig. 2.

Den detaljerte fremgangsmåte for oppnåelse av radioelektroforetogrammene for oligosaccharidene frigjort fra IgG fra forskjellige individer, som illustrert i fig. 5, var som følger: En aliquot (5×10^6 cpm) av [^3H]-oligosaccharider ble utsatt for høyspenningspapirelektroforese (80 V/cm) i pyridin:eddiksyre:vann (3:1:387 volum/volum), pH 5,4 (Camag HVE-celle 61000). Etter scanning med en Berthold LB280 radio-kromatogram-scanner, ble områdene N (nøytral), A-1 (monosialylert), A-2 (disialylert) eluert og dpm i hvert område bestemt slik

- at mengdeforholdene i hver prøve kunne beregnes. Analoge signaler fra scanneren ble digitalisert ved å bruke en Nelson analytisk ADC-tilpasningsenhet og de digitale verdier ble samlet opp og analysert ved å bruke en mikrodatamaskin.
- 5 Lactose (L), (2-3)→siallyllactose (SL); bromfenol-blått (BPB).

Innenfor hver undersøkelse faller de to sykdomstilstander uventet sammen med en identisk reduksjon i antallet kjeder som avsluttes med én eller to N-acetyl-neuraminsyre-
rester, til tross for de ikke-identiske endringer i nivået
10 av galactosylering. Utstrekningen av denne reduksjon ad-
skiller seg imidlertid i de to undersøkelsene [36% reduksjon
i Oxford-undersøkelsen) ($p = 0,001$, OA og RA) og 12% reduk-
sjon i Tokyo-undersøkelsen ($p = 0,002$, OA, $p = 0,3$, RA)].

15

20

25

30

35

Tabell 1 Prosent oligosaccharid-kjeder som mangler galactose i serum IgG^x

5	Individuelle pasienter	Kontroll	Osteo- artritt	Reumatoid artritt
	Oxford-serier	Oxf1 26.6 Oxf2 23.9 Oxf3 23.9 Oxf4 23.4 Oxf5 16.2 Oxf6 19.3	Oxf7 38.9 Oxf8 36.0 Oxf9 26.5 Oxf10 35.2 Oxf11 31.4 Oxf12 33.0	Oxf13 51.5 Oxf14 54.7 Oxf15 41.9 Oxf16 43.6 Oxf17 54.9 Oxf18 55.0
10	Tokyo-serier	Tok1 31.4 Tok2 26.8 Tok3 38.9 Tok4 25.4 Tok5 23.3	Tok6 32.2 Tok7 32.7 Tok8 32.7 Tok9 47.4 Tok10 43.2 Tok11 32.4	Tok12 44.3 Tok13 53.8 Tok14 52.4 Tok15 48.4 Tok16 43.9 Tok17 47.9 Tok18 74.5 Tok19 56.2 Tok20 55.6 Tok21 51.8 Tok22 44.3 Tok23 38.7
15				
20	Aritmetisk middelværdi ± standardavvik	Oxf 22.9 ± 3.7 Tok 29.2 ± 6.2	33.5 ± 4.3 36.7 ± 6.1	50.1 ± 5.9 50.1 ± 9.1

25 Sammenslått kontroll- Bern-1 24,0 serum

30 * Blodprøver i Oxford-seriene ble skaffet tilveie fra pasienter ved St. John's Highfield Hospital, Droitwich, Storbritannia og Queen Elizabeth Medical Centre, Birmingham, Storbritannia. Pasientene Oxf13 - Oxf18 og Tok12 - Tok23 oppfylte kriteriene til American Rheumatism Association for klar eller klassisk reumatoid artritt. Oxfordpasientene varierer i alder fra 50 til 75 år (gjennomsnittlig RA 64 ± 8 sa, OA 68 ± 9 sa). Analysene ble utført som dobbeltblindprøver, idet kliniske forløp ble beholdt etter fullførelse av oligo-
35 saccharidanalysene. I Oxford-seriene var pasientene Oxf7, 13 og 14 Rose-Waaler titer-positive. Rose-Waaler testen er en spesialisert antiglobulintest hvor det brukes erythrocyter fra sau som er gjort følsomme med en subagglutinerings-

dose av anti-sauerythrocyt IgG fra kanin. Rheumatoid faktor bindes til membranbundet IgG hvorved det fåes agglutinin. Se Rose et al., Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 68, 1 (1948). Pasientene Oxf7 og Oxf8 hadde langvarig osteoartritt og hadde like før vist tegn på en betennelseskomponent (henholdsvis 6 måneder og 9 måneder). Bern-1 henviser til IgG fra det sammenslåtte serum av flere tusen individer og var en vennlig gave fra Dr. U. Nydegger ved Blood Transfusion Center of the Swiss Red Cross, Bern, Sveits. Ikke-galactosylerte oligosaccharider ble isolert på følgende måte. Asiolo oligosaccharider (1×10^7 cpm) fra IgG fra hvert individ ble tilført en Ricin CA-120 agarose-kolonne (Miles-Yeda Ltd., Israel, Lot. nr. AR26) av størrelse 6 mm x 20 cm. Kolonnen ble fremkalt i 5 mM natriumacetat (pH 5,6). Ikke-galactosylerte strukturer eluerte i det "tomme" volum, mens digalactosylerte og monogalactosylerte strukturer eluerte senere og ved unike volumer. Antallet galactoseenheter i hver topp ble bekreftet enten ved å sende toppene gjennom den samme Ricin communis agarosekolonne på nytt, eller ved å følge endringen i hydrodynamisk volum etter spalting med β -N-acetyl-hexosaminidase fra jacktrebønne (14 μ M substrat, 150 enheter ml^{-1} enzym i 0,1 M citratfosfat, pH 4,5). Det hydrodynamiske volum av digalactosylerte strukturer endret seg ikke, volumet av monogalactosylerte strukturer avtok med 2 g.u. og volumet av strukturer som manglet galactose avtok med ≥ 4 g.u. For Oxford-seriene var forskjellene i de aritmetiskegjennomsnittsverdier signifikante med $p = 0,002$ (C vs OA) og $p = 0,001$ (c vs RA) og $p = 0,002$ (OA vs RA). For Tokyo-seriene var signifikansen $p = 0,05$ (C vs OA), $p = 0,0007$ (C vs RA) og $p = 0,0008$ (OA vs RA). Alle forskjeller i de aritmetiske gjennomsnittsverdier mellom de to seriene ble ikke ansett for å være statistisk signifikante. Forholdene mellom digalactosylerte og monogalactosylerte strukturer beholdt som beskrevet ovenfor, var følgende: C - $0,87 \pm 0,10$; OA - $0,75 \pm 0,14$; RA - $0,63 \pm 0,12$. Den statistiske signifikans for disse er C vs OA ($p = 0,15$), C vs RA ($p < 0,02$), OA vs RA ($p = 0,1$). Statistiske analyser ble utført ved å bruke en ikke-parametrisk statistisk prøve av sammensatt orden (Wilcoxon - Mann - Whitney test som

beskrevet av Lloyd, "Handbook of Application Mathematics",
6 Statistics, Part B, John Wiley and Sons, 1984). Sannsyn-
ligheter er notert for en to-delt test med en null-hypotese
 $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ testet mot en alternativ hypotese $H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$.

5

Tabell 2 Prosent oligosaccharid-kjeder som inneholder
terminalt $\alpha(2-6)$ -bundet N-acetyl-neuraminsyre *

	Nøytral	Monosialylert	Disialylert	
10				
	<u>Oxford-serier</u>			
	Kontroller	75.7 ± 5.0	20.5 ± 5.0	3.8 ± 1.6
	Osteoartritt	84.7 ± 1.8	13.7 ± 1.5	1.7 ± 0.7
	Reumatoid artritt	85.2 ± 1.1	12.6 ± 1.2	2.2 ± 0.6
15				
	<u>Tokyo-serier</u>			
	Kontroller	75.6 ± 0.8	17.8 ± 2.1	6.6 ± 1.6
	Osteoartritt	78.6 ± 2.1	16.5 ± 1.8	5.0 ± 0.9
	Reumatoid artritt	78.4 ± 4.4	15.2 ± 3.2	6.5 ± 1.5

- 20 * Se beskrivelse av fig. 5 ovenfor. For å bekrefte at alle struk-
turer som er tilstede i A-1 og A-2 posisjonene i fig. 5,
inneholdt henholdsvis bare en og to sialinsyrerester, ble
en aliquot av de eluerte A-1 og A-2 oligosaccharidfraksjoner
tilført en QAE - A25 Sephadex[®]-kolonne (6 mm x 10 cm).
- 25 Prøver ble tilført i 2 mM ammoniumacetat (pH 5,3) og kolonnen
fremkalt med en 2 mM til 350 mM lineær gradient av ammonium-
acetat. Både A-1 og A-2 fraksjonene fra papirelektroforesen
ga enkle elueringstopper som svarte til standard-eluerings-
posisjonene til henholdsvis monosialylerte og disialylerte
- 30 oligosaccharider. QAE-A25 Sephadex[®] er en kryssbundet
dextran-ionebytterharpiks med den funksjonelle gruppe diethyl-
(2-hydroxypropyl)aminoethyl.

35

166302

20

Resultatene ovenfor viser at osteoartritt og særlig reumatoid artritt er forbundet med markerte endringer i nivået for ytterarm-galactosylering av de komplekse N-bundne oligosaccharider i det totale serum-IgG. Den absolutte galactosyleringsgrad ble funnet å være sykdomsspesifikk. De iaktatte endringer i galactosylering samsvarer i stor grad med begge sykdomstilstander ($p = 0,002$ OA vs C, $p = 0,001$ RA vs C) og mellom sykdomstilstandene ($p = 0,002$ OA vs RA). Det er viktig at ingen nye primære oligosaccharidsekvenser ble funnet å være forbundet med IgG fra noen av artritt-tilstandene. Mer betydningsfull enn tapet av galactose (-33% i reumatoid artritt), er den økte eksponering av den ikke-reduserende ende i N-acetylglucosamin (-100%). På basis av fenomenet med oligosaccharidparing i Fc og dens begrensninger, avslører enkle beregninger at det ville være en konsekvent og markert økning i forekomsten av Fc-molekyler som totalt mangler galactose (-300% ved reumatoid artritt og -60% ved osteoartritt). Det hierarkiske sett av endringer som begynner med et endret galactosyleringsnivå og fortsetter via en endring i de relative populasjoner av et konstant sett oligosaccharidstrukturer, fører således, over paringsfenomenet, til dramatiske endringer i forekomsten av individuelle Fc-subpopulasjoner.

25

30

35

P a t e n t k r a v

Frengangsmåte for diagnose av reumatoid artritt eller
5 osteoartritt som et eneste syndrom eller som en komponent i
andre reumatiske sykdommer,
k a r a k t e r i s e r t v e d at en reduksjon i
ytterarmgalactosylering i en IgG-komponent eller et fragment
derav på 34-59 % i en pasients blodserum eller plasma eller
10 leddvæske bestemmes ved å analysere med hensyn på forekomsten
av ikke-reduserende, terminale ytterarm-N-acetylglucosamin-
rester i IgG-komponenten eller fragmentet ved direkte
kjemiske, enzymatiske eller lectinbaserte prøver på eksponert
N-acetylglucosamin eller indirekte ved bestemmelse av f.eks.
15 endringer i molekylvekt eller hydrodynamisk volum og sammen-
ligne med tilsvarende normale kontrollverdier.

20

25

30

35

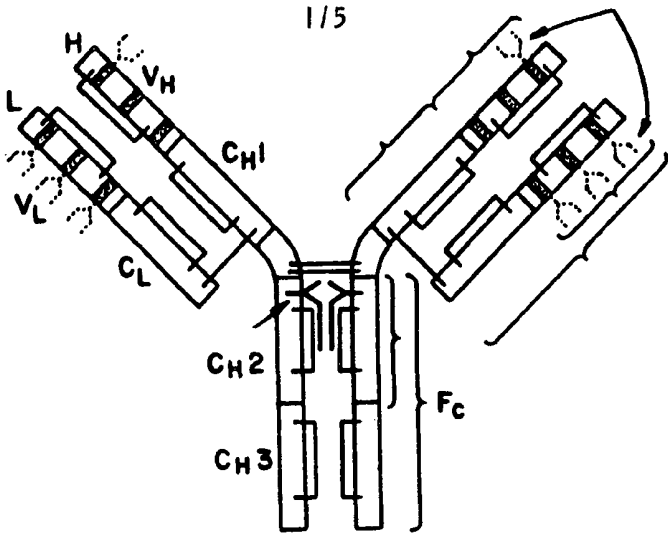


FIG. 1 a.

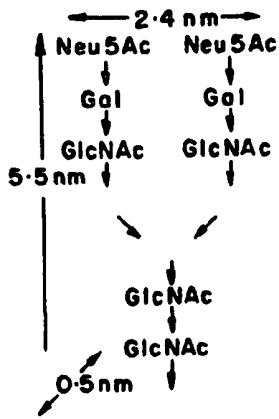


FIG. 1 b.

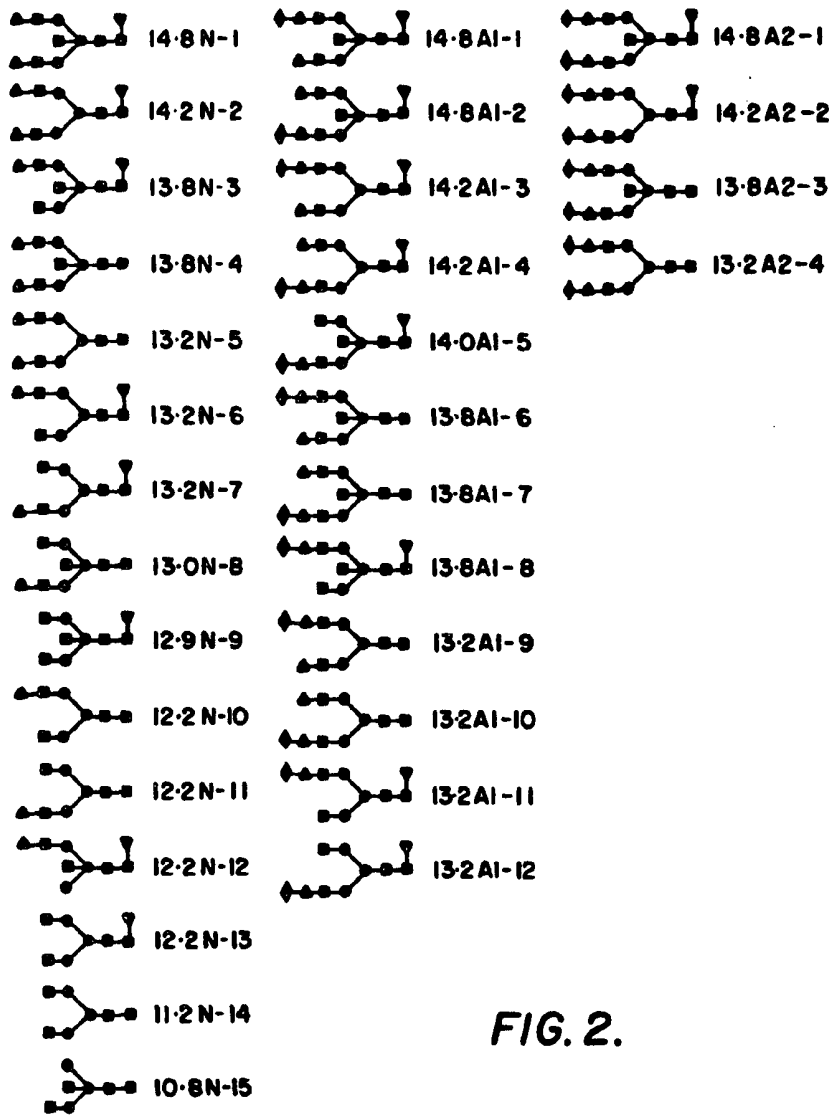
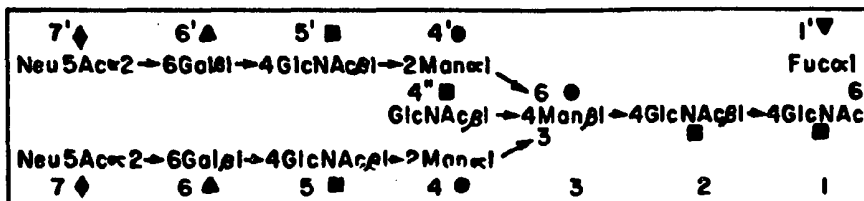


FIG. 2.



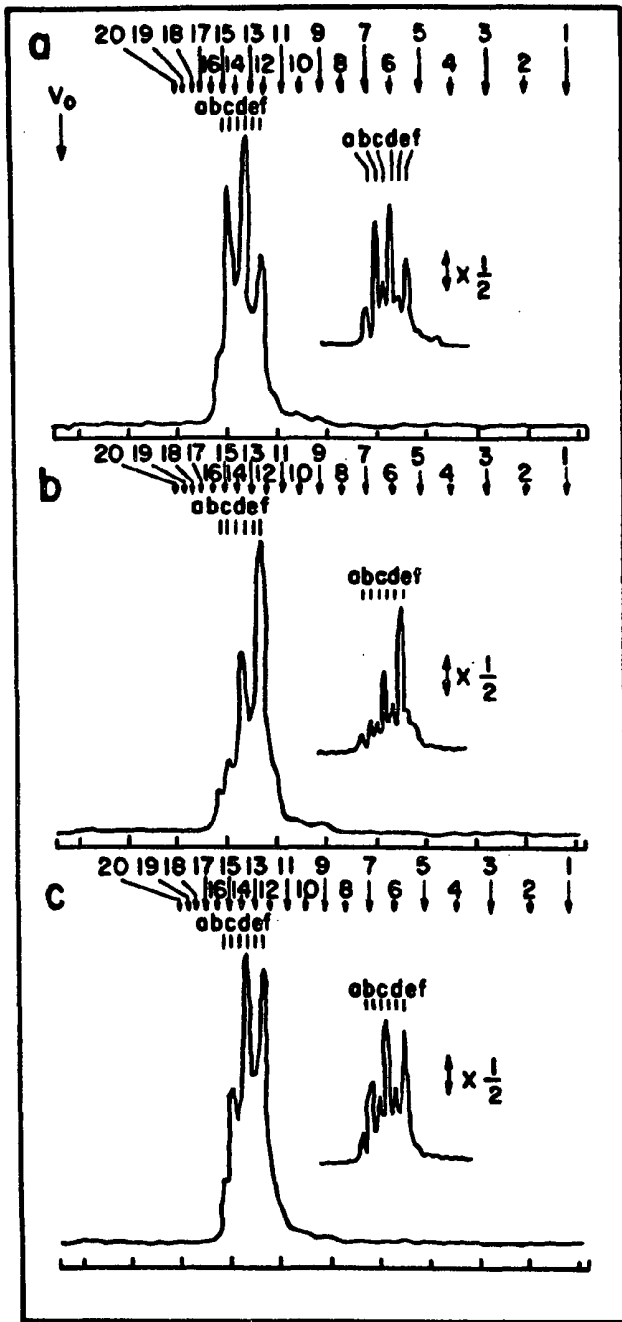


FIG. 3.

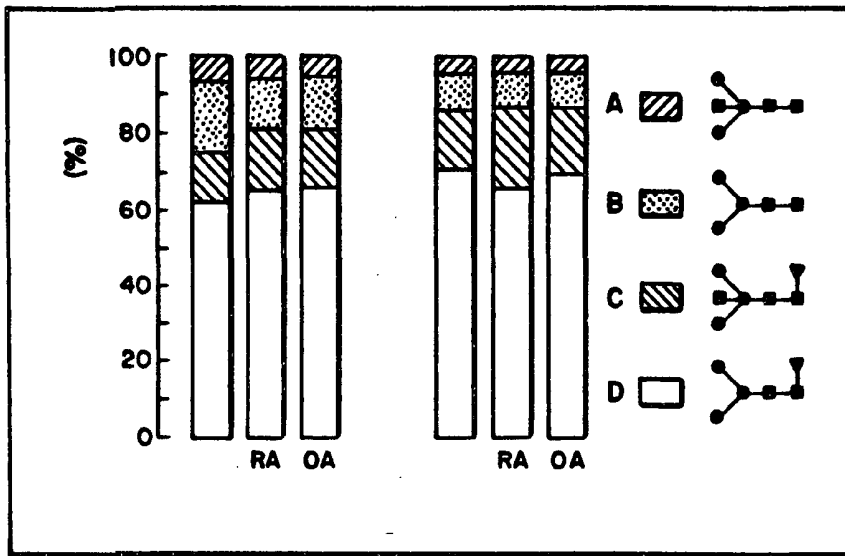


FIG. 4.

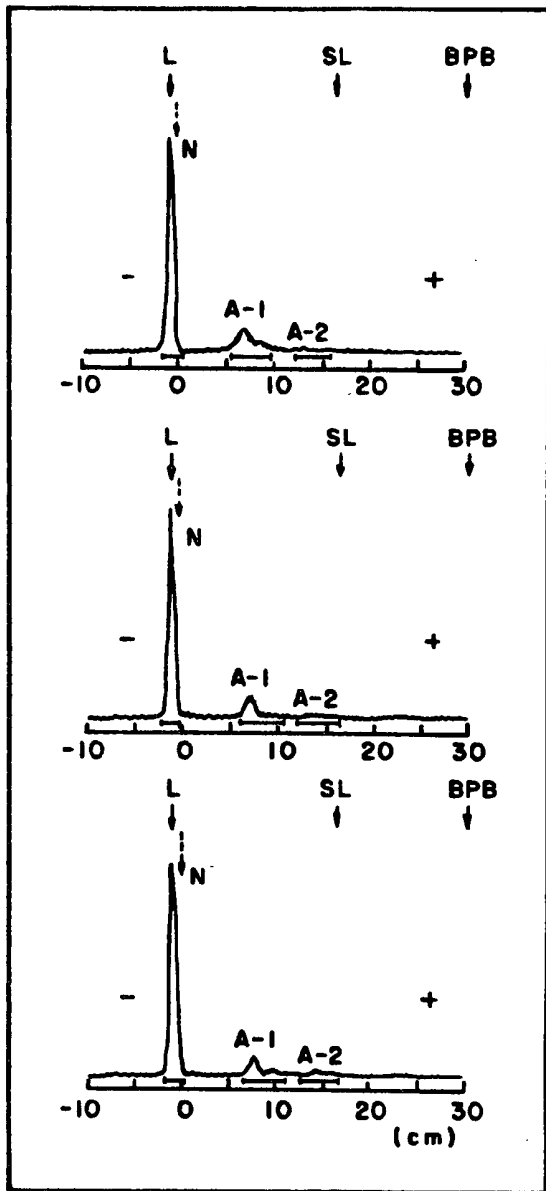


FIG. 5.