

(19) DANMARK



(12) PATENTSKRIFT

(11)

DK 175191 B1

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: C 07 K 7/06 C 07 K 16/18 C 12 N 5/00

(21) Patentansøgning nr: PA 1989 00525

(22) Indleveringsdag: 1989-02-03

(24) Løbedag: 1989-02-03

(41) Alm. tilgængelig: 1989-08-05

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-07-05

(30) Prioritet: 1988-02-04 DE 3803330 1988-02-26 DE 3806198

(73) Patenthaver: Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Tyskland

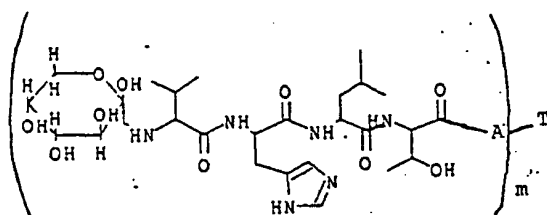
(72) Opfinder: Christian Klein, Bluetenstr. 16, 8120 Weilheim, Tyskland
Christa Huebner-Parajsz, Marienstr. 11, 8132 Tutzing, Tyskland
Wolfgang Rollinger, Baerenmuehlweh 98, 8120 Weilheim, Tyskland
Ulrich Essig, Waldpromenade 28 B, 8035 Gauting, Tyskland
Lorenz Krescher, Paul-Loebe-Str. 21, 8122 Penzberg, Tyskland
Hans-Georg Batz, Traubinger-Str. 63, D-82327 Tutzing, Tyskland

(74) Fuldmægtig: Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark

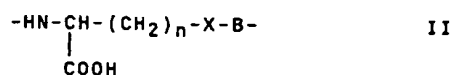
(54) Benævnelse: Monoklonalt og polyklonalt antistof mod HbA_{1c}

(57) Sammendrag:

Et immunogen til udvinding af HbA_{1c}-specifikke antistoffer med den almene formel I:



hvor m betyder 1-40, T betyder er et bærerprotein og A er et afstandsstykke, der har en kædelængde på 10 til 20 atomer med følgende formel II:



hvor X er S eller NH, n er 1 til 4 og B er en organisk rest, der indeholder en succinimidgruppe.

Den foreliggende opfindelse angår et monoklonalt og et polyklonalt antistof mod HbA_{1c}.

Hæmoglobin, der bevirker transporten af indåndet oxygen og CO₂,
5 og som er lokaliseret i de røde blodlegemer, består af fire
kæder, hvoraf hver to har samme struktur. Overvejende består
det af to α -kæder og to β -kæder. Hæmoglobin foreligger i blo-
det med mere end 90% som denne form, der betegnes HbA₀.

Glycosyleret hæmoglobin fremkommer in vivo ved en ikke-enzyma-
10 tisk reaktion mellem hæmoglobin og glucose. Glycosyleringen
forløber over dannelsen af en Schiffsk base mellem glucosens
aldehydgruppe og hæmoglobinets aminogruppe. Det dannede aldi-
min omlejres ved en Amadori-omlejring til en N-(1-desoxy-D-
fructos-1-yl)-rest. I denne omlejrrede form er det glycosylere-
de hæmoglobin stabilt.

15 De glycosylerede hæmoglobiner betegnes med HbA₁ og det vigtig-
ste i denne gruppe betegnes HbA_{1c}. HbA_{1c} fremkommer ved glyco-
sylering af den frie aminogruppe i valin-resten, der befinder
sig i aminoenden af hæmoglobins β -kæde. Derved fremkommer en
N-(1-desoxy-D-fructos-1-yl)-L-valin-rest, der i det følgende
20 betegnes "fructose-valin".

Koncentrationen af HbA_{1c} i blod afhænger af blodets sukkerkon-
centration. Andelen af HbA₁ i forhold til den samlede mængde
hæmoglobin ligger hos voksne normalt i området fra 3 til 6%.
Ved forhøjet blodsukkerniveau tiltager andelen af glycosyle-
25 rede hæmoglobiner i forhold til det samlede hæmoglobin, og den
kan stige op til 15%. Bestemmelsen af HbA_{1c}-andelen er derfor
en pålidelig parameter til kontrol af sukkerstofskiftet. Da en
erythrocyt og med denne det stabile HbA₁ gennemsnitligt bliver
120 dage gammel, giver bestemmelsen af andelen af glycosylere-
de hæmoglobiner i blod således en god parameter til at kon-
30 trollere carbonhydratstofskiftet, hvilket er særligt vigtigt
for diabetespatienter. Denne parameter er uafhængig af en
kortvarig forhøjelse af blodsukkerniveauet efter et carbonhy-
dratrigt måltid og tjener således som en langtidsparameter.

Det er derfor til diagnose af diabetes og til overvågning af diabetespatienter vigtigt at bestemme andelen af HbA_{1c} specifikt i blod.

- 5 Til analysen af glycosylerede hæmoglobiner findes der en række af fremgangsmåder. De mest velkendte metoder beror på tabet af positive ladninger i hæmoglobinmolekylet, når de frie amino-grupper i β -kæderne omsættes med glucose. Frem for alt anvendes søjlekromatografiske og elektroforetiske metoder. Andre
10 metoder forsøger kolorimetrisk at bestemme det indbyggede glucosemolekyle eventuelt fructosemolekylet efter Amadori-omlejringen (thiobarbitursyremetoden).

De tidligere kendte metoder er dels yderst tidsrøvende og om-
15 stændige og dels heller ikke tilstrækkeligt specifikke for det glycosylerede hæmoglobin.

Der bestod således et behov for en simpel bestemmelsesmetode, der på yderst specifik måde registrerer denne glycolyserede
20 andel af det samlede hæmoglobin.

Sådanne enkelte fremgangsmåder er de for fagfolk velkendte forskellige varianter af immunbestemmelser. Ved homogene kompetitive immunbestemmelser konkurrerer f.eks. et mærket HbA_{1c}-derivat med HbA_{1c} fra den prøve, der skal måles, om antistofferne. Som mærket HbA_{1c}-derivat kan anvendes et kort syntetisk peptid, der udgør en epitop af HbA_{1c}, og som er bundet til en markør. For at man nu skal kunne gennemføre bestemmelsen reproducerbart med nøjagtige resultater, må der anvendes et an-
25 tistof, der binder det mærkede peptid og HbA_{1c} fra prøven med tilnærmelsesvis lige høj affinitet for faktisk at muliggøre en konkurrencereaktion. Til gennemføring af immunbestemmelser må der derfor tilvejebringes antistoffer, der meget specifikt genkender HbA_{1c}, dvs. som specifikt binder til den glycosylerede N-terminale ende af HbA_{1c}- β -kæden, men som ikke binder
35 til den tilsvarende ikke-glycosylerede N-terminale ende af HbA₀- β -kæden.

En yderligere variant af konkurrerende eller kompetitiv immunbestemmelse gennemføres i heterogen fase. Herved konkurrerer f.eks. et fastfasebundet syntetiseret peptid, der indeholder en HbA_{1c}-epitop, med HbA_{1c} fra prøven om de specifikke antistoffer. Det fastfasebundne peptid kan f.eks. være et konjugat af okseserumalbumin og et syntetisk glycosyleret peptid, der har sekvensen fra en epitop af HbA_{1c}. Også til gennemføring af denne variant skal antistoffet binde peptidet og HbA_{1c} fra prøven med tilnærmelsesvis lige høj affinitet.

10

For nu at kunne gennemføre en følsom og specifik fremgangsmåde til påvisning af HbA_{1c} var det væsentligt at opnå et antistof, der specifikt binder HbA_{1c} men ikke HbA₀.

15 Der kendes allerede fremgangsmåder til påvisning af HbA_{1c} ligesom egnede antistoffer til fremgangsmåden, f.eks. fra EP-A 185.870. Alle kendte antistoffer lider imidlertid under den ulempe, at de udviser en meget ringe affinitet for HbA_{1c}-molekylet. Som regel må der derfor før gennemføringen af en bestemmelse foretages en denaturering for at frigøre de antigene
20 determinanter af HbA₁ i så vidt omfang, at antistofferne kan blive bundet i tilstrækkeligt omfang. En sådan fremgangsmåde er omstændelig.

25 De ved fremgangsmåden ifølge EP-A 185.870 anvendte immunogener har desuden den ulempe, at de kun fremkalder en lidet specifik immunreaktion. Således kunne der ifølge den der beskrevne fremgangsmåde kun udvindes polyklonale fåre- og muse-sera, der ikke har nogen målelig specificitet med hensyn til adskillelsen mellem HbA_{1c} og HbA₀.
30

Fra DE offentliggørelsesskrift nr. 34 39 610 kendes en fremgangsmåde til udvinding af antistoffer mod HbA_{1c}, hvor der som immunogen anvendes et konjugat af en sukkerart, en peptidrest
35 af β -kæden fra hæmoglobin og en immunogen bærer. De ved denne fremgangsmåde opnåede antistoffer udviser imidlertid ingen tilstrækkeligt selektivitet og deres relative affinitet er ringe.

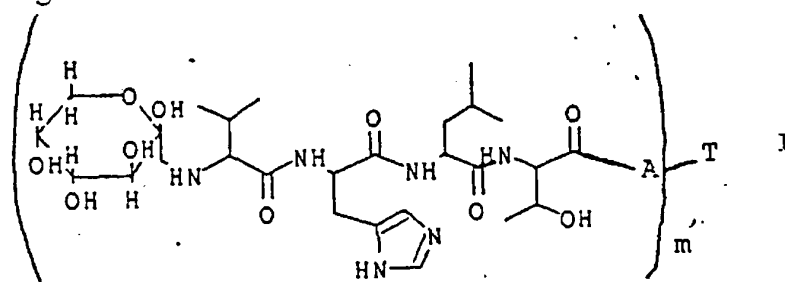
Det var således formålet med den foreliggende opfindelse ud fra denne kendte teknik at tilvejebringe højspecifikke polyklonale og monoklonale antistoffer mod HbA_{1c} med høj affinitet.

- 5 Det var endvidere formålet med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe antistoffer, der over for det naturlige HbA_{1c}-molekyle og et peptid, der udviser den N-terminale sekvens af hæmoglobins β -kæde, udviser molære relative affiniteter, der adskiller sig med en så lille faktor som muligt fra hinanden.

10

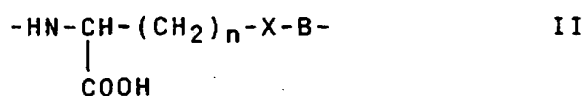
Dette opnås med et monoklont eller et polyklont antistof mod HbA_{1c}, der er ejendommeligt ved, at det udviser en høj affinitet til HbA_{1c}, ikke binder til HbA₀ og er opnåeligt ved at et immunogen med den almene formel I

15



- 15 hvor m betyder 1 til et tal, der svarer til 25 vægt% haptensafstandsstykke-grupper i forhold til bærerproteinets vægt, T betyder et bærerprotein og A et afstandsstykke, der har en kædelængde på 10 til 20 atomer og har følgende formel II

20



- 25 hvor X betyder S eller NH, n betyder 1 til 4 og B betyder en organisk rest, der indeholder en succinimidgruppe, indsprøjtes i en organisme, der er i stand til at danne antistoffer, hvorefter antistofferne udvindes fra organismen.

- 30 Det er på overraskende måde blevet fastslået, at der ved anvendelse af de omhandlede immunogener kan opnås højspecifikke antistoffer, hvis selektivitet og affinitet langt overgår de hidtil kendte HbA_{1c}-antistoffer.

Immunogenet ifølge opfindelsen består af tre dele - en haptendel, der svarer til HbA_{1c}-proteinets N-terminale ende, et afstandsstykke og et immunogent protein. Haptendelen i immunogenet ifølge opfindelsen indeholder de første 4 aminosyrer fra hægoglobins β -kædes N-terminale ende og desuden et fructosemolekyle. Som i det naturlige HbA₁-protein er fructosemolekylets C₁-atom i immunogenet ifølge opfindelsen bundet til aminosyrerne valin, histidin, leucin og threonin.

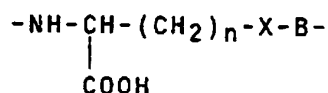
- 10 Fremstillingen af haptendelen sker på i og for sig kendt måde. Fastfasesyntese (en oversigt gives af G. Barany og R. W. Merrifield i Gross, Meienhofer, The Peptides, bind 2, side 3 - 285, New York, 1978) har vist sig som værende særligt egnet. Til dette beskyttes α -aminogrupperne hensigtsmæssigt med N- α -fluorenylmethoxycarbonylgrupper. Sidekædefunktionerne beskyt-
- 15 tes som tert-butylether, tert-butylester eller som tert-butoxycarbonylgruppe. Disse beskyttelsesgrupper bliver også fjernet ved den acidolytiske spaltning af det færdige syntetiserede peptid fra bæreren. N-(1-desoxy-D-fructos-1-yl)-resten ind-
- 20 føres på i og for sig kendt måde ved omsætning af peptidet med glucose.

- Ved efterfølgende Amadori-omlejring (jvf. K. Heyns og H. Paulsen, J. Liebigs Ann. Chem. 627 (1959), side 160 - 174 og H. Röper et al., Carbohydrates. 116 (1983), side 183 - 195) opnår
- 25 man det ønskede N-(1-desoxy-D-fructos-1-yl)-peptid.

- En yderligere for opfindelsen væsentlig bestanddel af det immunogene konjugat er afstandsstykket, der forbinder haptenet
- 30 med det immunogene protein. Afstandsstykket udviser ifølge opfindelsen en kædelængde på 10 til 20 atomer, idet kæden kan være dannet carbonatomer, oxygenatomer, nitrogenatomer og/eller svovlatomer. Til kædelængden tælles kun de atomer, der danner kæden, og ikke hydrogenatomerne eller sidegruppe-
- 35 atomerne.

Afstandsstykket bindes til threonins carboxylgruppe.

Afstandsstykket udviser følgende almene formel:



5

hvor X betyder S eller NH og n er et helt tal fra 1 til 4. Fortrinsvis har X betydningen S og n 1 eller X er NH og n 4.

10

Gruppen B i den almene formel står for et i sig selv kendt afstandsmolekyle, der indeholder en succinimidylgruppe. Opbygningen af gruppen B er ikke i sig selv kritisk, men den må dog indeholde så mange kædemolekyler, at den sammen med den øvrige del af afstandsstykket giver en kædelængde på 10 til 20 atomer. Fortrinsvis anvendes en succinimidylhexanoylgruppe, som

15

Afstandsstykket indføres på i og for sig kendt måde. Det indeholder en aminosyre, der målrettet kan bindes til peptidets C-terminale ende og som bærer en gruppe NH₂ eller SH. Over denne aminogruppe eller mercaptogruppe kan succinimidylgruppen, der formidler bindingen med bærerproteinet, indføres. Fortrinsvis anvendes der som aminosyre cystein, homocystein, lysin eller ornithin. Hvis afstandsstykket som aminosyre indeholder cystein eller homocystein, kan man som startaminosyre til fastfasesyntese af peptidet først anvende cystein eller homocystein med beskyttet mercaptogruppe, idet der som beskyttelsesgruppe fortrinsvis anvendes en tert-butylsulfenylgruppe. Derefter omsætter man bærerproteinet med en bifunktionel kobler, der leverer succinimidylgruppen, som f.eks. maleimidohexanoyl-N-hydroxysuccinimid, og kobler derefter afstandsstykke-bærerprotein-konjugatet til cysteins eller homocysteins frigjort SH-gruppe. Hvis afstandsstykket som aminosyre indeholder lysin eller ornithin anvender man fortrinsvis først aminosyren med beskyttet α-amingruppe som startaminosyre til fastfasesyntesen af peptidet, idet der som beskyttelsesgruppe fortrinsvis anvendes en carbobenzoxygruppe, og derefter omsættes peptidets frigjort α-aminogruppe med den bifunktionelle kobler. Peptid-aminosyre-afstandsstykke-konjugatet kobles derefter til bærer-

35

proteinet, idet bindingen sker over bærerproteinets SH-grupper.

5 Som bærerprotein kan anvendes i sig selv kende proteiner. Egnede er f.eks. albuminer, såsom okseserumalbumin og ovalbumin, hæmocyaminer såsom Keyhole limpet hemocyanine, polyaminosyrer såsom poly-L-Lys og poly-L-(Lys:Glu) eller enzymer såsom galactosidase. Fortrinsvis anvendes som bærerprotein edestin eller

10 Til bærerproteinets bindes fortrinsvis flere hapten-afstands-stykke-grupper. Antallet af bundne grupper afhænger af bærerproteinets størrelse. Som regel kan der højst bindes hapten-afstandsstykke-grupper svarende til 25% af bærerproteinets vægt. Dersom der anvendes edestin som protein bindes fortrinsvis 10 til 30 hapten-afstandsstykke-grupper.

Med de omhandlede immunogener opnås højaktive, specifikke antistoffer mod HbA_{1c}. Disse antistoffer udviser meget ringe krydsreaktivitet med HbA₀.

20 Antistofferne ifølge opfindelsen kan opnås ved en fremgangsmåde til udvinding af antistoffer rettet mod HbA_{1c}. Ved denne injiceres immunogenet ifølge opfindelsen flere gange i en egnet organisme, hvorefter antistoffet på i sig selv kendt måde udvindes. Til udvinding af antistoffer immuniseres som regel pattedyr. Egnede er f.eks. mus, får, kaniner, rotter eller marsvin. Immunogenet indsprøjtes i værtsdyret, fortrinsvis opløst i en puffer og under tilsætning af et sædvanligt hjælpestof, f.eks. Freund's adjuvans. For at

25 opnå en høj antistoftiter gentages indsprøjtningen med regelmæssige mellemrum, f.eks. hver anden til hver fjerde uge. Ud fra værtsdyrets blod udvindes på sædvanlig måde antisera, der indeholder de polyklonale antistoffer.

30

Med immunogenerne kan der også udvindes højspecifikke monoklonale antistoffer under anvendelse af den kendte hybridiseringsfremgangsmåde ifølge G. Köhler og C. Milstein, der f.eks. er beskrevet i Nature 266, (1977), side 495 og Science 208, (1980), side 692 ff. Ved denne metode isolerer man efter immunisering af værtsorganismen B-lymfocytter fra det immuniserede dyrs milt, der fusioneres med myelomceller og de dannede hybridomceller klones. Ud fra de dannede kloner isoleres derefter de cellelinier, der producerer antistoffer, der reagerer specifikt med HbA_{1c} og som praktisk talt ikke udviser krydsreaktion med andre molekyler. Isoleringen af disse cellelinier er simpel, da en meget stor andel af klonerne producerer specifikke antistoffer. Disse cellelinier dyrkes videre og deraf kan man derefter udvinde de ønskede monoklonale antistoffer. Antistofaktiviteten bestemmes på i og for sig kendt måde i serum eller hybridomsupernatanten, sædvanligvis under anvendelse af en enzym-immunbestemmelse.

Antistofferne ifølge opfindelsen udmærker sig ved en høj specificitet og høj affinitet mod HbA_{1c}. Krydsreaktionen med ikke-glycosyleret hæmoglobin og med andre i legemsvæskerne tilstedeværende proteiner er lille og ubetydelig. Antistofferne egner sig derfor på fremragende måde til anvendelse ved metoder til bestemmelse af HbA_{1c} i legemsvæsker.

Særligt egnede monoklonale antistoffer er MAK 3.609.325, 3.51.56 og 3.230.140. De tilsvarende hybridom-cellelinier er deponeret under accessionsnumrene ECACC 87120801, ECACC 88122302 og ECACC 88122301 hos European Collection of Animal Cell Cultures, Proton Down, GB, og er omfattet af den foreliggende opfindelse.

Opfindelsen belyses nærmere ved hjælp af følgende figurer og eksempler.

Fig. 1 viser en standardkurve for aktiviteten mod HbA_{1c} hos monoklonale anti-HbA_{1c}-antistoffer (MAK 3.609.325).

Fig. 2 viser titerbestemmelse (dobbelbestemmelse) for det ifølge eksempel 14 opnåede antiserum.

Fig. 3 viser et diagram over antistoffets relative affiniteter mod peptider og hæmoglobin.

Eksempel 1

5

Peptidet fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys-OH syntetiseredes. Fast-fasesyntese gennemførtes i en halvautomatisk peptidsyntesizer fra Firmaet Labortec, Bubendorf (Schweiz).

10 Som N- α -aminobeskyttelsesgruppe anvendtes en Fmoc-gruppe (fluorenylmethoxycarbonylgruppe). En beskrivelse af peptidsyntesemetoden findes i J. Meyenhofer et al., Int. J. Peptid Protein Res. 13, 35-42 (1979).

15 Den C-terminale Fmoc-aminosyre kobledes som beskrevet af Meyenhofer til p-alkyloxybenzylalkohol-harpiks (Firmaet Bachem, Bubendorf, Schweiz).

Synteseplan for en syntesecyklus:

20

Trin	Tid	Reagen/opløsningsmiddel
1	2 x 1 min	DMF (dimethylformamid)
2	1 x 3 min	piperidin/DMF 1:4
3	1 x 7 min	piperidin/DMF 1:4
4	4 x ½ min	DMF
5	2 x ½ min	isopropanol
6	stop	ninhydrinprøve
7	2 x 1 min	DMF
8	stop	tilsætning af næste Fmoc-aminosyre og HOBt (1-hydroxybenzotriazol) i DMF
9	2 min	omrystning
10	stop	tilsætning af DCC (dicyklohexylcarbodiimid) i DCM (dichlormethan)
11	90 min	kobling
12	3 x 1 min	DMF
13	2 x 1 min	isopropanol
14	stop	ninhydrinprøve

30

35 Til koblingen ifølge trin 8 til 11 anvendes Fmoc-aminosyrerne og DCC hver i den tredobbelte molære mængde regnet på det, der er bundet til udgangsharpiksen. HOBt anvendes i den 4,5-foldige molære mængde.

Efter kobling af den sidste N-terminale Fmoc-aminosyre gennemløbes trinnene 1 til 5 af syntescykklussen til fraspaltning af Fmoc-beskyttelsesgruppen. Derefter omrystes harpiksen i det 15-foldige rumfang dichlormethan (DCM)/trifluoreddikesyre (TFA) 1:1 i to timer ved stuetemperatur. Der filtreres, harpiksen vaskes yderligere to gange med DCM/TFA 4:1, alle filtrater forenes og inddampes under vakuum og under toluentilsætning ved 25°C. Der sættes diethylether til remanensen. Det faste stof filtreres fra og tørres.

10

Ifølge det ovennævnte skema syntetiseredes peptidet fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys(StBu)OH. Som udgangsharpiks anvendtes 10 g Fmoc-Cys(StBu)p-alkoxybenzylalkoholharpiks ladet med 0,6 mMol/g. Ved syntescykklussen anvendtes følgende Fmoc-aminosyrer efter hinanden:

15

1. 6,2 g Fmoc-Thr(tBu)

2. 6,4 g Fmoc-Leu

3. 11 g Fmoc-His(Trt)

20

4. 6,1 g Fmoc-Val.

Der anvendes følgende forkortelser:

tBu: tert-butylether

25

Trt: trityl

StBu: tert-butylthioether

OtBu: tert-butylester

Z: benzyloxycarbonyl

-Cys(StBu): tert-butylsulfenylcystein

30

Det rå udbytte efter fraspaltning af harpiks var 3,29 g H-Val-His-Leu-Thr-Cys(StBu)-OH. Tyndtlagskromatografi (TLC): (kiselgel HPTLC Merck, elueringsmiddel: ethanol/iseddike/vand 6:2:2) $R_f = 0,62$. Efter besprøjtning med ninhydrin 0,1% (Merck) og fremkaldelse ved 120°C i 5 minutter fremkom der en rødviolet farvning. Ved besprøjtning med en blanding af 200 ml 0,4% methanolisk resorcinopløsning og 40 ml 5 N svovlsyre (resorcin-svovlsyre) og fremkaldelse ved 120°C i 5 til 10 minutter fremkom der ingen farvning.

35

Til 1 g af det rå peptid sættes 540 mg glucose og 50 ml pyridin/iseddike og der omrøres i 5 dage ved stuetemperatur. Derefter indampes der ved stuetemperatur under vakuum, hvorefter remanensen yderligere 3 gange blev optaget i 50 ml vand og igen indampet til tørhed. Remanensen blev optaget i 50 ml vand, påførtes en kolonne med Dowex 50 WX8 (H^+ -form, 50 x 3,5 cm) og vaskedes med vand, indtil den samlede mængde glucose var elueret. Derefter elueredes produktet med 1 N ammoniak og lyofiliseredes. Der blev opnået 810 mg. Lyofilisatet blev optaget i 0,1 M triethylammoniumacetatpuffer, pH 8,5, og vaskedes på en kolonne med Affigel 601 (Biorad, 5 x 26 cm) med 2 l 0,1 M triethylammoniumacetatpuffer, pH 8,5, og derefter med 2 l vand. Produktet elueredes derefter med 0,1% myresyre og lyofiliseredes. Det således opnåede lyofilisat kromatograferedes på Polygosil C18, 5 μ (Macherey og Nagel) (gradient 0,1% TFA i vand til 95% isopropanol i vand, 0,1% TFA). Der opnåedes 283 mg fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys(StBu)-OH. TLC: (Kieselgel, elueringsmiddel som ovenfor): R_f = 0,58. Farvning med ninhydrin: brunlig. Farvning med resorcin-svovlsyre: rødbrun. Fab-MS (Fast Atom Bombardment MS) (positiv): MH^+ = 822.

Til fraspaltning af cysteinbeskyttelsesgruppen opløstes det ovenfor opnåede peptid i 130 ml 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 8,5, afgassedes flere gange og beluftedes påny med nitrogen. Til opløsningen sættes derefter 778 mg dithiotretiol og der henstilledes i 24 timer under nitrogen. Derefter syrnedes med HCl til pH 5 og rensedes ved kromatografering på Polygosil C18 (gradient som ovenfor).

Der opnåedes 178 mg fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys-OH
FabMS; positiv: MH^+ = 734.

Eksempel 2

Ifølge det i eksempel 1 viste synteseskeam syntetiseredes peptidet fructose-Val-His-Leu-Thr-Lys-OH. Som udgangsharpiks anvendtes 10 mg Fmoc-Lys(Z)-p-alkoxybenzylalkohol-harpiks ladet med 0,48 mmol/g. Ved syntesecyklussen anvendtes følgende Fmoc-aminosyrer efter hinanden:

1. 5 g Fmoc-Thr(tBu)
2. 5,1 g Fmoc-Leu
3. 8,9 g Fmoc-His(Trt)
4. 4,9 g Fmoc-Val.

5

Råudbytte efter fraspaltning fra harpiksen: 3,2 g.

TLC: (kiselgel HPTLC, elueringsmiddel se eksempel 1.3): R_f = 0,58.

10

Det rå peptid omrørtes med 1,6 g glucose ved stuetemperatur i 150 ml pyridin/iseddike 1:1. Reaktionsopløsningen inddampedes og remanensen rensedes som beskrevet i eksempel 1.3 på Dowex 50WX8 H^+ og Affigel 601.

15

Der opnåedes 1,7 g fructose-Val-His-Leu-Thr-Lys(Z)-OH.

TLC: (kiselgel HPTLC, elueringsmiddel se eksempel 1): R_f = 0,58; farvning med svovlsyre-sprøjtereagens: rødbrun.

20

1H -NMR (300 Mhz, D_2O): δ = 0,85 (d, $J=5,1$ Hz, 3H); 0,89 (d, $J=4,9$ Hz, 3H); 0,96 (d, $J=7,1$ Hz, 3H); 1,04 (d, $J=6,8$ Hz, 3H); 1,20 (d, $J=1,20$, 3H); 1,3-1,9 (m, 9H); 2,3 (m, 2H); 3,0-3,3 (m, 6H); 3,63-4,1 (m, 5H); 4,1-4,29 (m, 4H); 4,32 (d, $J=5,4$ Hz, 1H); 4,45 (m, 1H); 4,48 (m, 2H); 5,09 (s, 2H); 7,32 (s, 1H); 7,4 ("s", 5H); 8,63 ppm (s, 1H).

25

400 mg af det ovenfor vundne produkt hydrogeneredes i 50 ml methanol/vand 5:1 med palladium-aktivt kul. Katalysatoren filtreredes fra og der inddampedes og kromatograferedes på Polygosil C18.

30

Udbytte: 300 mg.

35

TLC (kiselgel HPTLC, elueringsmiddel se eksempel 1): R_f = 0,09. Farvning med svovlsyre-sprøjtereagens: rødbrun.

Eksempel 3

10 mg fructose-Val-His-Leu-Thr-Lys-OH fra eksempel 2 blev op-
taget i 1 ml 0,1 M kaliumphosphatpuffer pH 7. Der tilsattes
5 6,2 mg maleimidoheksansyre-N-hydroxysuccinimidester i 2 ml
ethanol. Reaktionsopløsningen omrørtes i 14 timer ved stuetem-
peratur og rensedes på Polygosil C18. Efter lyofilisering af
de rene fraktioner opnåedes 4,3 mg fructose-Val-His-Leu-Thr-
Lys-(maleimidoheksanoyl)-OH.

10

FAB-MS, positiv; MH^+ = 952.

1H -NMR (300 MHz, DMSO (D_6)/ CD_3OD): = 0,83 - 1,06 (m, 12H; Leu-
CH₃, Val-CH₃); 1,04 (d, J=6,5 Hz, 3H; Thr-CH₃); 2,01 (t, J=6,5
15 Hz, 2H; MH-CO-CH₂) og 6,92 ppm (s, 2H; MH-CH=CH).

Eksempel 4

5 g edestin fra hampefrø (Roth) omrørtes i 500 ml 0,1 M kali-
umphosphatpuffer, pH 7,0, og der tilsattes en opløsning af 500
20 mg maleimidoheksansyre-N-hydroxysuccinimidester i 100 ml etha-
nol. Opløsningen omrørtes i 90 minutter ved stuetemperatur,
det faste stof afsugedes, der vaskedes to gange med hver gang
100 ml vand, fire gange med 100 ml ethanol og yderligere to
25 gange med 100 ml vand. Det faste stof opslæmmedes i 150 ml
vand og lyofiliseredes.

Udbytte: 4,34 g

30 Maleiminidogrupper/mol edestin: 17

Antallet af maleiminidogrupper bestemtes på følgende måde:

Opløsning A: 1 mM cystein, 0,5 mM EDTA i vand.

35

Opløsning B: 10 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoat) (Ellmann's
reagens) i 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 8,0.

Opløsning C: 1 M tris, HCl pH 8,2.

8 mg maleimidohexanoyl-edestin optages i 39 ml 0,05 M kaliumphosphatpuffer og behandles i 15 minutter i et ultralydbad.

5

Derefter tilsættes 1 ml opløsning A og der inkuberes i 10 minutter ved 25°C.

Med 3,2 ml opløsning C omrøres i 2 minutter ved 25°C og derefter tilsættes 200 µl opløsning B, og der inkuberes i 10 minutter ved 37°C. Ved 25°C centrifugeres prøven i 15 minutter.

I den ovenstående væske måler man ekstinktionen ved 405 nm. Blindværdien opnås ved at gå frem på analog måde uden anvendelse af maleimidohexanoyl-edestin-prøven. Antallet af maleimidogrupper i nmol er $\frac{\Delta E[mE]}{13,3} \cdot 43,4$, hvor ΔE er ekstinktions-

differensen mellem blindværdien og prøven. Den molære mængde edestin får man ved den nøjagtige indvejning og edestins relative molmasse på 310.000: $\frac{mg \text{ prøve}}{0,31} = nmol \text{ edestin}$.

250 mg af det således opnåede maleimidohexanoyl-edestin fik under argonatmosfære tilsat 20 ml 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 6,5. Der tilsattes ligeledes under udelukkelse af oxygen 34 mg fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys-OH opnået ifølge eksempel 1 og omrørtes i 29 timer ved stuetemperatur. Opløsningen centrifugeredes, bundfaldet vaskedes 3 gange med vand og blev hver gang påny centrifugeret. Den faste remanens opslæmmedes i 10 ml vand og lyofiliseredes. Der opnåedes 175 mg konjugat af fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys-OH og maleimidohexanoyl-edestin, der betegnes som immunogen 1.

Som beskrevet ovenfor bestemtes de endnu frie maleimidogrupper. Ud fra differensen i forhold til den oprindelige ladning fremgår det, at immunogenet indeholder 14,6 mol peptid pr. mol edestin.

Eksempel 5

48 mg β -galactosidase (EIA-kvalitet, Boehringer Mannheim GmbH) opløstes under argonatmosfære i 2 ml med argon begasset 0,1 M kaliumphosphatpuffer pH 7,0. Der tilsattes under udelukkelse af oxygen 5 mg fructose-Val-His-Leu-Thr-Lys(MH)-OH som var opnået ifølge eksempel 3, og der omrørtes 1 time ved stuetemperatur.

- 10 En AcA 202-kolonne (2 x 24 cm) ækvilibreredes med argon-mættet 0,9% NaCl. Den samlede reaktionsopløsning påførtes på denne kolonne. Der elueredes med argon-mættet 0,9% NaCl og proteinfraktionen opsamledes. Der opnåedes 15 ml immunogen-opløsning, $c=3,1$ mg/ml. Ladningen med immunogen kan derefter bestemmes ved omsætning af en prøve med Ellmann's reagens: pr. mol SH-grupper frigøres 1 mol carboxynitrothiopyridon ($\lambda_{\max} = 412$ nm, $\epsilon = 13.600$ ved pH 8,0).

- 20 β -galactosidase EIA-kvalitet indeholder 14 SH-grupper pr. molekyle. Efter reaktionen med peptidet findes der to frie SH-grupper, dvs. ladningen er på 12 mol peptid pr. mol β -galactosidase.

- 25 Det opnåede konjugat af fructose-Val-His-Leu-Thr-Lys(MH)-OH og β -galactosidase betegnes som immunogen 2.

Eksempel 6

- 30 Til sammenligning fremstilledes et immunogen, som udviser en længere peptidkæde. Til dette fremstilledes først peptidet Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys-OH ved at følge det i eksempel 1 beskrevne synteseskema.

- 35 Ud fra synteseskemaet i eksempel 1 fremstilledes peptidet H-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH. Som startharpiks anvendtes 10 g Fmoc-Cys(StBu)-p-alkoxybenzylalkoxyharpiks med en ladning på 0,5 mmol/g. I syntesecyklussen anvendtes følgende aminosyrer:

1. 6,4 g Fmoc-Glu(OtBu)
2. 6,4 g Fmoc-Glu(OtBu)
3. 5,1 g Fmoc-Pro
4. 6 g Fmoc-Thr(tBu)
- 5 5. 5,3 g Fmoc-Leu
6. 9,3 g Fmoc-His(Trt)
7. 5,1 g Fmoc-Val; koblingen blev gentaget en gang.

Råudbytte efter fraspaltning af harpiksen: 4,2 g. Det rå produkt blev kromatograferet på Polygosil C18 på den i eksempel 1 beskrevne måde. Udbyttet udgjorde 880 mg H-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH; TLC (kiselgel, elueringsmiddel som i eksempel 1): $R_f = 0,53$. 800 mg af dette peptid blev derefter på den i eksempel 1 beskrevne måde omsat med glucose og oprensedes på Dowex 50WX8 H^+ -form og derefter Affigel 601. Efter kromatografering på Polygosil C18 opnåedes 150 g produkt. FabMS, positiv: $MH^+ = 1177$. Analogt med eksempel 1 fraspaltedes cysteinbeskyttelsesgrupperne derefter ved tilsætning af dithiothreitol. Der opnåedes 78 mg fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys-OH. FabMS positiv: $MH^+ = 1087$.

Det således opnåede peptid omsættes med 322 mg maleidohexanoyledestin som beskrevet i eksempel 4. På denne måde opnås 200 mg immunogen, der anvendes som sammenligningsimmunogen V1.

Eksempel 7

Som yderligere sammenligningsimmunogen fremstilledes et konjugat af fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys og pyridyldithiopropionyledestin. Peptidet fremstilledes som i eksempel 2.

Til fremstilling af pyridyldithiopropionyledestin blev 1 g edestin fra hampefrø optaget i 150 ml 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 7,5. Til denne opløsning sættes under omrøring 10 mg succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat opløst i 12,5 ml ethanol. Der omrørtes i 2 timer, derefter afsugedes det faste stof, og der vaskedes 3 gange med 100 ml vand hver gang, 1 gang med 100 ml ethanol og yderligere 1 gang med 100 ml vand. Det faste stof blev optaget i 100 ml vand og lyofiliseredes.

352 mg af det således opnåede pyridyldithiopropionyledestin fik under argonatmosfære tilsat 100 ml 0,05 M kaliumphosphatpuffer, pH 6,0. Der tilsattes ligeledes under udelukkelse af oxygen 49,5 mg af peptidet fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys og der
5 omrørtes i 23 timer ved stuetemperatur. Derefter centrifugeredes, bundfaldet vaskedes 3 gange med 50 ml vand hver gang, 2 gange med 50 ml ethanol hver gang og nok 1 gang med vand og der blev hver gang igen fracentrifugeret. Den faste remanens blev optaget i 50 ml vand og lyofiliseret. Til bestemmelse af
10 ladningen målttes det frigjorte thiopyridon i den ovenstående væske fra den første centrifugering. Der opnåedes 300 mg af det som sammenligningsimmunogen V2 betegnede konjugat af fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys og pyridyldithiopropionyledestin. Ladningen udgjorde 39 mol peptid pr. mol edestin.

15

Eksempel 8

Til gennemføring af sorteringsprøver på anti-HA_{1c}-antistof fremstilles polyhaptener. Polyhaptent 1 fremstilles ud fra H-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys-OH og pyridyldithiopropionyl-
20 okseserumalbumin.

1 g okseserumalbumin opløstes i 30 ml 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 7,5. Til denne opløsning sættes 226 mg succinimidylpyridyldithiopropionat opløst i 15 ml ethanol. Der omrørtes i 40
25 minutter ved stuetemperatur og den samlede reaktionsopløsning kromatograferedes over ACA 202 (31 x 3 cm); eluat 0,1 M kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Der opnåedes 152 ml proteinopløsning, c = 6,6 mg/ml. Til opløsningen sættes 280,5 mg dithiothretiol
30 og der opfyldtes med 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, til 10 ml. Der fortyndedes med en faktor på 6. Koncentrationen af frigjort thiopyridon svarede til koncentrationen af de anvendte dithiopyridylgrupper. Ud fra ekstinktionskoefficienten for thiopyridon ved 340 nm på 8.080 og edestins relative molmasse
35 på 310.000 kan ladningen bestemmes. Den er 36 mol/mol protein.

10,5 ml af den opnåede opløsning af pyridyldithiopropionyl-okseserumalbumin og 47 mg H-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys-OH,

opnået ifølge eksempel 6, omrørtes under argon (oxygenudelukkelse) i 1 dag. Ladningen beregnedes ved bestemmelse af det frigjorte thiopyridon til at være 33 mol peptid/mol protein. Tilbageværende reaktionsdygtige grupper afmattedes ved til-

5 sætning af 1,7 mg cystein. Den samlede reaktionsopløsning kromatograferedes over en ACA 202-kolonne (31 x 3 cm), proteinfraktionen dialyseredes natten over mod H₂O og lyofiliseredes. Det opnåede produkt betegnes som polyhaptent 1.

10 Udbytte: 85 mg.

Eksempel 9

Til fremstilling af polyhaptent 2 (jvf. eksempel 8) anvendes 7

15 ml pyridyldithiopropionyl-okseserumalbumin-opløsning opnået som beskrevet i eksempel 6. Som peptidkomponent anvendes 7,8 mg af det ifølge eksempel 6 fremstillede peptid som på aminosyren Val bærer en fructosedel. Til dette omsættes 800 mg af det ifølge eksempel 6 opnåede peptid H-Val-His-Leu-Thr-Pro-

20 Glu-Glu-Cys-OH som beskrevet i eksempel 1 med glucose og oprenses på Dowex 50WX H-form og derefter på Affigel 600. Efter kromatografering på Polygosil C18 opnås 150 mg af det glycosylerede peptid. FabMS positiv, MH⁺ = 1177. Efter fraspaltning af cysteinbeskyttelsesgruppen med dithiothreitol opnås ud fra

25 100 mg af det glycosylerede peptid 78 mg af det ønskede produkt. FabMS positiv MH⁺ = 1089. Det således opnåede produkt betegnes som polyhaptent 2.

Eksempel 10

30

For at erkende tilstedeværelsen og specificiteten hos antistoffer mod HbA_{1c} i serum fra immuniserede mus eller i den ovenstående kulturvæske fra hybridceller eller ascites anvendes en Elisa-metode som prøveprincip:

35

Mirotiterplader blev belagt med 10 µg polyhaptent 2 eller 10 µg polyhaptent 1/ml belægningspuffer (0,2 M natriumcarbonat/-bicarbonat, pH 9,3 til 9,5) ved stuetemperatur i 1 time under

rystning. Derpå efterbehandlede der i 10 minutter med 0,9% natriumchloridopløsning og 1% albuminopløsning. Efterfølgende vaskedes med 0,9% natriumchloridopløsning. Derefter inkuberedes ved stuetemperatur i ca. 1 time med 100 μ l prøve, og der vaskedes påny med 0,9% natriumchloridopløsning. Der efterfulgte en yderligere inkubation i 1 time med 200 U/ml af et fåre-Fab-anti-muse-Fcy-peroxidase-konjugat. Efter et nyt vasketrin med 0,9% natriumchlorid bestemmes peroxidaseaktiviteten på sædvanlig måde, idet man omsætter i 15 minutter ved stuetemperatur med ABTS. Derefter bestemmes ekstinktionsdifferensen, forskel mE, ved 405 nm.

De antisera, der blev opnået efter immunisering med det ifølge opfindelsen anviste, ifølge eksempel 4 opnåede immunogen 1 gav hos alle 100 immuniserede mus en binding med polyhaptten 2 og ingen eller kun en svag binding til polyhaptten 1. Der opnåedes således antistoffer, der binder selektivt til polyhaptten 2.

Blandt antisera, der blev opnået efter immunisering med det ifølge opfindelsen anviste, ifølge eksempel 6 fremstillede immunogen 2, reagerede 6 af 18 af de fra immuniserede mus opnåede sera med polyhaptten 2 og ikke med polyhaptten 1. Bindingen til polyhaptten 2 var her lige så god som med immunogen 1. Også her blev der således opnået selektive antistoffer.

Ved den til sammenligning gennemførte immunisering med sammenligningsimmunogen V1 blev der fra 100 mus opnået en antiserum, der med præference reagerede med polyhaptten 2, idet alle 99 andre antisera reagerede lige godt med begge polyhaptener. Her kunne der således ikke opnås et antistof, der binder selektivt til polyhaptten 2.

Ved immunisering med sammenligningsimmunogen V2 kunne ingen differentierende muse-antisera opnås. Alle de fra 100 mus opnåede antisera reagerede lige godt med begge polyhaptener. Bindingen til polyhaptenerne var her svagere med en faktor på 10 i forhold til de med de ifølge opfindelsen anviste immunogener 1 og 2 opnåede sera.

Eksempel 11

Balb/c-mus og B10.D2-mus, 8 til 12 uger gamle, immuniseredes først med 100 µg HbA_{1c} (β 1-4 Cys, MHS)-edestin (immunogen 1) i komplet Freund's adjuvans (CFA) intraperitonealt (i.p.). Efter 6 uger og 10 uger gennemførtes 2 yderligere immuniseringer. Herved blev der indgivet 100 µg immunogen i ufuldstændigt Freund's adjuvans (IFA). 10 dage efter den sidste immunisering blev musene tappet for blod for at bestemme antistoftiteren i serumen. 4 dage og 3 dage før fusion blev musene påny immuniseret intravenøst hver gang med 100 µg immunogen i puffer.

Til fusion blev i analogi med Galfré, Methods in Enzymology, 73 (1981), side 3, 1×10^8 miltceller fra en immuniseret mus blandet med 2×10^7 myelomceller (P3 x 63 Ag8-653, ATCC-CRL 8275) og efterfølgende centrifugeret i 10 minutter (300 g, 4°C). Cellerne vaskedes påny med BSS (= balanced salt solution) og centrifugeret ved 400 g i et 50 ml spidsrør. Den ovenstående væske fjernedes. Cellesedimentet løsnedes og der tilsattes 1 ml 60% PEG-opløsning (MG 4000, Merck). Efter 1 minut i vandbad blev der ved stutemperatur tildryppet 5 ml RPMI 1640-medium (RPM = Rosewell Parker Memory Institut) uden kalvefosterserum (FKS) i et tidsrum på 4 til 5 minutter, der genblandedes, fyldtes op med medium til 50 ml og derefter centrifugeredes der i 10 minutter ved 400 g, 4°C. De sedimenterede celler blev optaget i RPMI 1640-medium med 10% FKS. Hver 10^5 miltceller blev indpodet på 24-brønds-cellekulturplader (Firma Nunc). Til hver kultur sattes 5×10^4 peritoneal-ekssudat-celler som foderceller. Den følgende dag tilsattes hypoxanthin-azaserin-selektionsmedium (100 mM hypoxanthin, 1 µg/ml azaserin).

Efter ca. 7 til 10 dage kunne der allerede ses flere kloner. Den ovenstående væske fra primærkulturerne afprøvedes efter en i eksempel 10 beskrevet ELISA-fremgangsmåde. Primærkulturer, der kun viste en ringe eller slet ingen krydsreaktion med HbA_{1c} klonedes videre ved hjælp af en fluorescensaktiverende celsorter (FACS) på 96-brønds-cellekulturplader (Firma Nunc). Som

foderceller tjente 1×10^4 peritoneal-ekssudat-celler pr. brønd.

På denne måde kunne man f.eks. isolere de hybridom-cellelinier, der er blevet deponeret hos European Collection of Animal Cell Cultures under accessionsnumrene (1.) ECACC 87120801, (2.) ECACC 88122302 og (3.) ECACC 88122301. Ud fra disse cellerlinier kunne der opnås de monoklonale antistoffer (1) 3.609.325, (2) 3.51.56 og (3) 3.203.140.

Til opnåelse af ascites blev mus sprøjtet intraperitonealt med 5×10^6 hybridceller, som forud var blevet forbehandlet 1 til 2 gange med 0,5 ml Pristan. 1 til 3 uger senere kunne der ud fra musene udvindes ascites-væske med en IgG-koncentration på 5 til 20 mg/ml. Herfra kunne antistofferne isoleres på sædvanlig måde. Disse monoklonale antistoffer er rettet specifikt mod HbA_{1c} og viser ingen eller kun ringe krydsaktivitet med HbA₀.

Eksempel 12

Materialer

	Mikrotiterplader:	A: NUNC 4-42404 II B: NUNC 2-69620
25	12-kanal-pipette:	Dynatech, katalog nr. 77-887-00
	Pladeryster:	Flow Laboratories, Titertek, katalog nr. 77-471-00
	Afdækningsfolier:	Dynatech Plate Sealers, katalog nr. M 30
30	ELISA-aflæser:	Dynatech MR 700
	Belægningspuffer:	50 mM natriumcarbonat, pH 9,6
	Prøvepuffer:	10 mM natriumphosphat, pH 7,4, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20, 1% crotein C
	Vaskepuffer:	0,9% NaCl, 0,1% Tween 20
35	Antistof-enzym-konjugat:	konjugat af peroxidase og Fab-fragmentet af et polyklonalt antistof fra får, der er rettet mod Fcγ-delen af muse-IgG, 25 mU/ml i prøvepuffer

- Substrat: 100 mmol/l phosphat-citrat-puffer pH 4,4
3,2 mmol/l natriumperborat
1,9 mmol/l ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfon-syre(6)]-diammoniumsalt)
- 5
- Antistof: MAK 3.609.325 (ECACC 87120801)
- Polyhapten: Polyhapten 1 ifølge eksempel 8
Polyhapten 2 ifølge eksempel 9
- 10 Antigen: HbA_{1c} naturligt
HbA₀ naturligt.

Ved et forforsøg bestemtes de antistofmængder, der skulle anvendes ved de egentlige specificitetsforsøg.

15

Til dette blev mikrotiterplader belagt med henholdsvis polyhapten 1 eller polyhapten 2. I 100 ml skåle blev 1 µg polyhapten pr. ml belægningspuffer inkuberet i 1 time ved stuetemperatur. Derefter afsugedes opløsningen og vaskedes 3 gange med vaskepuffer.

20

Derefter sættes der til det fastfasebundne polyhapten fortyndingsrækker af antistof 3.609.325 (ascites), idet fortyndingen skete med prøvepuffer fra 1:100 i firertrin. Der inkuberedes hver gang med 100 µl/skål i 1 time ved stuetemperatur og vaskedes efterfølgende.

25

Det til polyhaptenet bundne antistof bestemtes ved tilsætning af et konjugat af peroxidase og Fab-fragmentet fra et polyklonalt antistof fra får, som er rettet mod Fcγ-delen af muse-IgG, ud fra reaktionen mellem peroxidase og tilsat substrat. Der tilsættes 100 µl konjugat/skål og inkuberedes i 1 time ved stuetemperatur. Eftervisningsreaktionen startedes ved tilsætning af 100 µl substrat/skål til alle skåle. Målingen skete med en ELISA-aflæser ved 405 nm (referencebølgelængde 490 nm).

35

Som titer defineredes den antistoffortynding, hvor der sker en halvmaksimal binding. Denne antistofmængde anvendtes i de efterfølgende forsøg.

De monoklonale antistoffers specificitet undersøgtes. Til dette sammenlignedes de enkelte antistoffers reaktivitet med forskellige i opløsning værende komponenter.

- 5 I med 1% crotein C forudbelagte mikrotiterplader pipetteredes og blandedes 50 µl opløsning af monoklonalt antistof i dobbelt titerkoncentration og 50 µl antigenopløsning (fortyndingsrække, se nedenfor) og der inkuberedes i 30 minutter ved stuetemperatur. Derefter blev portioner på 100 µl af blandingen over-
- 10 ført til de med polyhaptten belagte mikrotiterplader.

Fortyndingsrækker:

- | | | |
|----|---|------------------------------|
| | Fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys(StBu)-OH
(ifølge eksempel 1) | fra 5 µg/ml
prøvepuffer |
| | Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu- | med prøve- |
| 15 | Cys(StBu)-OH (ifølge eksempel 6) | puffer i |
| | Fructose-Valin | firertrin |
| | H-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH
(ifølge eksempel 6) | fra 100 µg/ml
prøvepuffer |
| | HbA _{1c} | i firertrin |
| | HbA ₀ | |

20

Den koncentration i mol/l, der giver halvmaksimal binding, af et stof der skal bestemmes defineres som molær relativ affinitet.

- 25 Til sammenligning af et monoklonalt antistofs reaktivitet med forskellige bestanddele sættes den relative affinitet hos det monoklonale antistof for komponenten fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH lig 100%. Reaktiviteterne, der også betegnes som krydsreaktioner, med andre komponenter fremkommer
- 30 derefter ud fra kvotienten for de relative affiniteter på følgende måde:

$$35 \text{ Krydsreaktion} = \frac{C_{\text{rel.aff. fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH}^{(\text{nM})}}}{C_{\text{rel. aff. X}}^{(\text{nM})}} \times 100$$

De for de enkelte komponenter opnåede værdier fremgår af følgende tabel 1.

Derved bedømtes også de resultater, der blev opnået med forskellige, på analog måde opnåede antistoffer.

Tabellen viser, at der med immunogenet ifølge opfindelsen kan fremstilles mangfoldige monoklonale antistoffer, der meget specifikt binder $\text{HbA}_{1\text{C}}$ men ikke HbA_0 . Ved sammenligning med antistoffer, der er opnået under anvendelse af sammenligningsimmunogen V1 eller med de fra EPA 185.870 kendte antistoffer, erkender de ifølge opfindelsen opnåede antistoffer $\text{HbA}_{1\text{C}}$ uden særlig denaturering med væsentligt højere affinitet. De er derfor yderst egnede til konkurrerende immunbestemmelser.

15

20

25

30

35

Tabel 1

Specificitetsundersøgelser af (HbA_{1c})-kloner.

Resultater:

Reaktivitet med $\oplus$	KMC 19.2	KMC 19.3	MAK 1	MAK 2	MAK 3	MAK 4	MAK 5	MAK	MAK 6	MAK 7
	+	+	+	+	+	+	+	3.609.325	+	+
Polyhaptent 2			3.51.56	3.230.140						
Peptid A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
HbA _{1c} naturligt	4,4	9,4	15,3	20,0 22,0	20,7	40,4	25,0	40,0	4,1	7,1
Fructose-Valin	<0,29	<0,03	<0,01	n.b.	<0,56	<0,11	n.b.	n.b.	<0,04	<0,1
Polyhaptent 1	-	-	-	n.b.	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Peptid B	<0,06	<0,01	<0,01	<0,03	<0,1	<0,02	<0,04	<0,24	3	5,1
HbA ₀ naturlig	<3,5	<0,4	<0,13	<0,95	<6,0	<1,3	<1,1	<6,7	<0,5	<0,13

n.b. = ikke bestemt

+ Kloner med betegnelsen KMC: EPA 185.870

MAK 1 til MAK 5 og MAK 3.609.325: fremstillet med immunogen fra eksempel 4

MAK 6 og MAK 7

Peptid A: Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH

Peptid B: H-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH.

Eksempel 13

Som beskrevet i eksempel 12 pipetteres der til med 1% crotein C forud belagte mikrotiterplader hver 50 μ l af en opløsning af
5 MAK 3.609.325 i dobbelt titerkoncentration og 50 μ l HbA_{1c}-opløsning, der blandes og inkuberes ved stuetemperatur i 30 minutter. Der anvendes forskellige koncentrationer af HbA_{1c}.

Derefter overføres portioner på 100 μ l af blandingen til med
10 polyhaptten 2 belagte mikrotiterplader. Det til polyhaptten 2 bundne antistof eftervises som beskrevet i eksempel 12 ved hjælp af et konjugat af peroxidase og Fab-fragmentet fra et polyklonalt antistof fra får, som er rettet mod Fc γ -delen af muse-IgG.

15 Jo mere HbA_{1c} der er til stede i prøveopløsningen desto mindre antistof binder til polyhapttenet, dvs. desto lavere er den målte ekstinktion. På fig. 1 vises den ved bestemmelsen af HbA_{1c} opnåede kurve.

20

Eksempel 14

10 får immuniseredes med immunogen 1 eller 2 ifølge opfindelsen i komplet Freund's adjuvans. Dosen udgjorde i hvert tilfælde 200 μ g immunogen pr. dyr for den første og hver følgende
25 immunisering. Immuniseringerne fulgte med månedlige afstande.

De opnåede sera undersøgte som beskrevet i eksempel 12 med hensyn til tilstedeværelse og specificitet af antistoffer mod
30 HbA_{1c}. Hertil blev mikrotiterplader belagt med 0,04 μ g/ml polyhaptten 2. Som antistof-enzym-konjugat anvendtes et konjugat af peroxidase og et kanin-antifåre-immunoglobulin. Anvendelseskoncentrationen af dette konjugat udgjorde 150 mU/ml. Som antigener anvendtes naturligt HbA_{1c} og HbA₀, som peptider H-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys-OH og fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys-OH.
35

Fremgangsmåden gennemførtes som beskrevet i eksempel 12.

Der undersøgtes følgende prøver:

5 Sammensætning 1: Blanding af portioner af serumprøver fra alle 10 dyr, der var blevet behandlet med det ifølge opfindelsen anviste immunogen fra eksempel 4 (blodprøveudtagning 45 dage efter første immunisering).

10 Sammensætning 2: Blanding af portioner af serumprøver fra alle 10 dyr, der var blevet behandlet med det ifølge opfindelsen anviste immunogen 2 fra eksempel 5 (blodprøveudtagning 45 dage efter første immunisering).

15 Prøve a: Serumprøve fra får 3227, der var blevet behandlet med det ifølge opfindelsen anviste immunogen 1 fra eksempel 4 (blodprøveudtagning 165 dage efter den første immunisering).

20 Prøve b: Serumprøve fra får 3233, der var blevet behandlet med det ifølge opfindelsen anviste immunogen 1 fra eksempel 4 (blodprøveudtagning 165 dage efter den første immunisering).

25 Prøve c: Serumprøve fra får 3272, der var blevet behandlet med det ifølge opfindelsen anviste immunogen 2 fra eksempel 5 (blodprøveudtagning 75 dage efter den første immunisering).

30 Titerbestemmelsen gav følgende resultater:

Sammensætning 1: 1:5.400

Sammensætning 2: 1:8.400

Prøve a: 1:3.700

35 Prøve b: 1:3.600

Prøve c: 1:2.600

Fig. 2 viser et eksempel på ekstinktionsforløbet i afhængighed af antiserumkoncentrationen.

Eksempel 15

Som beskrevet i eksempel 14 bestemtes affiniteterne og specificiteterne hos antistoffer til glycosylerede og ikke-glycosylerede antigener. Resultaterne fremgår af tabel 2 og 3 samt fig. 3.

På fig. 3 betyder:

10	Kurve	Antigen	Maksimal anvendelseskoncentration
			(nmol/l)
	1	Peptid A	5340
	2	Peptid B	16000
	3	HbA _{1c}	2670
15	4	HbA ₀	2670

Tabellen viser, at der med immunogenerne ifølge opfindelsen kan fremstilles højspecifikke polyklonale antistoffer, der binder sig meget specifikt til HbA_{1c} men ikke til HbA₀. Det ses også, at de polyklonale antistoffer erkender HbA_{1c} uden denaturering med højere affinitet. Desuden fremgår det ud fra resultaterne fra de forskellige sammensætninger, der udgør en blanding af polyklonale antistoffer opnået ud fra hver 10 får efter behandling med immunogenet ifølge opfindelsen, at en meget stor procentdel af de immuniserede dyr producerer egne antistoffer ved anvendelse af immunogenerne ifølge opfindelsen.

30

35

Tabel 2

Antistoffers affinitet til glycosylerede og ikke-glycosylerede antigener

5

Prøve	Relativ affinitet (nmol/l)				Krydsreaktion
	Peptid A*	Peptid B**	HbA _{1c}	HbA ₀	HbA ₀ /HbA _{1c}
Sammen-					
10 sætning 1	21	>>16000	30	>>2670	<<1,1%
Prøve a	33	>>16000	115	>>2670	<<4,3%
Sammen-					
sætning 2	15	>>16000	18	>>2670	<<0,7%
Prøve c	21	>>16000	134	>>2670	<<5,0%

15

* Peptid A: Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH

** Peptid B: H-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Cys(StBu)-OH

20

25

30

35

Tabel 3Specificitetsundersøgelser af polyklonale antistoffer mod HbA_{1c}

5

Resultater:

	Reaktivitet med +	Sammensæt- ning 1	Prøve a	Sammen- sætning 2	Prøve c
10	Polyhaptent 2	+	+	+	+
	Peptid A	100	100	100	100
	HbA _{1c} naturligt	70	28,6	83,3	15,7
15	Polyhaptent 1	-	-	-	-
	Peptid B	<<0,13	<<0,2	<<0,09	<<0,13
	HbA ₀ naturligt	<<0,8	<<1,2	<<0,5	<<0,8

20 + Sammensætning 1, prøve a: fremstillet ud fra immunogen 1 fra eksempel 4

Sammensætning 2, prøve c: fremstillet ud fra immunogen 2 fra eksempel 5.

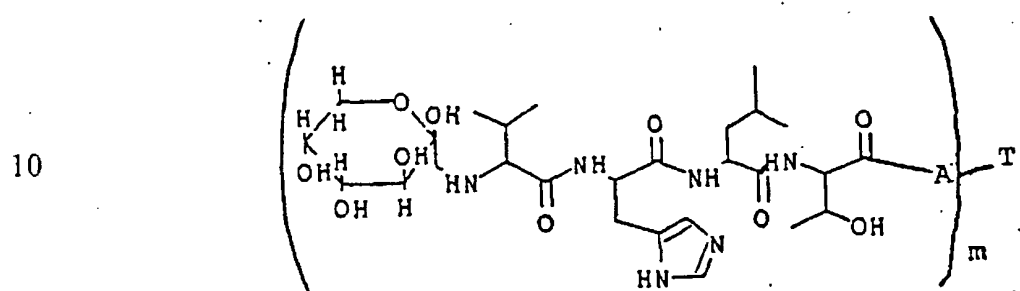
25

30

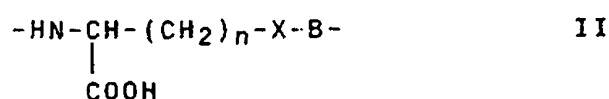
35

PATENTKRAV

1. Monoklonalt antistof mod HbA_{1c}, **kendetegnet ved, at** det udviser en høj affinitet til HbA_{1c}, ikke binder til HbA₀ og er opnåeligt ved at et immunogen med den almene formel I

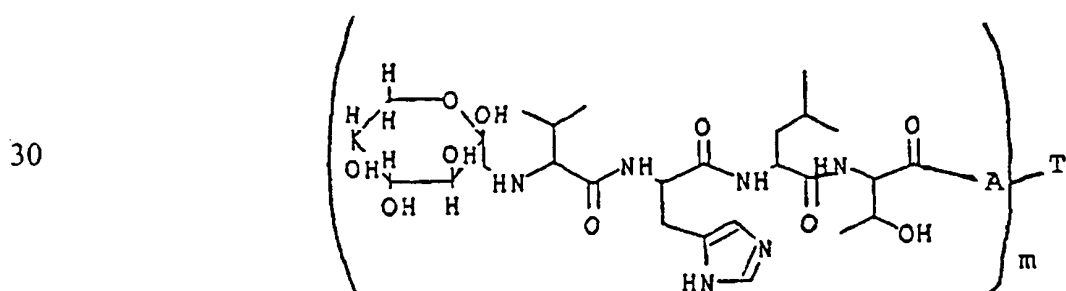


- 15 hvor m betyder 1 til et tal, der svarer til 25 vægt% hapten-afstandsstykke-grupper i forhold til bærerproteinets vægt, T betyder et bærerprotein og A et afstandsstykke, der har en kædelængde på 10 til 20 atomer og har følgende formel II



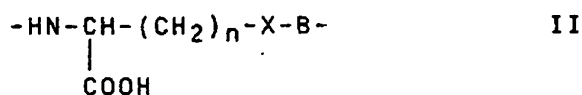
hvor X betyder S eller NH, n betyder 1 til 4 og B betyder en organisk rest, der indeholder en succinimidgruppe, indsprøjtes i en organisme, der er i stand til at danne antistoffer, hvorefter antistofferne udvindes fra organismen.

- 25 2. Polyklonalt antistof mod HbA_{1c}, **kendetegnet ved, at** det udviser en høj affinitet til HbA_{1c}, ikke binder til HbA₀ og er opnåeligt ved at et immunogen med den almene formel I



hvor m betyder 1 til et tal, der svarer til 25 vægt% hapten-afstandsstykke-grupper i forhold til bærerproteinets vægt, T betyder et bærerprotein og A et afstandsstykke, der har en kædelængde på 10 til 20 atomer og har følgende formel II

5



hvor X betyder S eller NH, n betyder 1 til 4 og B betyder en organisk rest, der indeholder en succinimidgruppe, indsprøjtes i en organisme, der er i stand til at danne antistoffer, hvorefter antistofferne udvindes fra organismen.

10

3. Monoklonalt antistof ifølge krav 1, **kendetegnet ved**, at det er dannet af hybridoma-cellelinje ECACC 87120801.

15

4. Monoklonalt antistof ifølge krav 1, **kendetegnet ved**, at det er dannet af hybridoma-cellelinje ECACC 88122302.

5. Monoklonalt antistof ifølge krav 1, **kendetegnet ved**, at det er dannet af hybridoma-cellelinje ECACC 88122301.

20

Fig.1

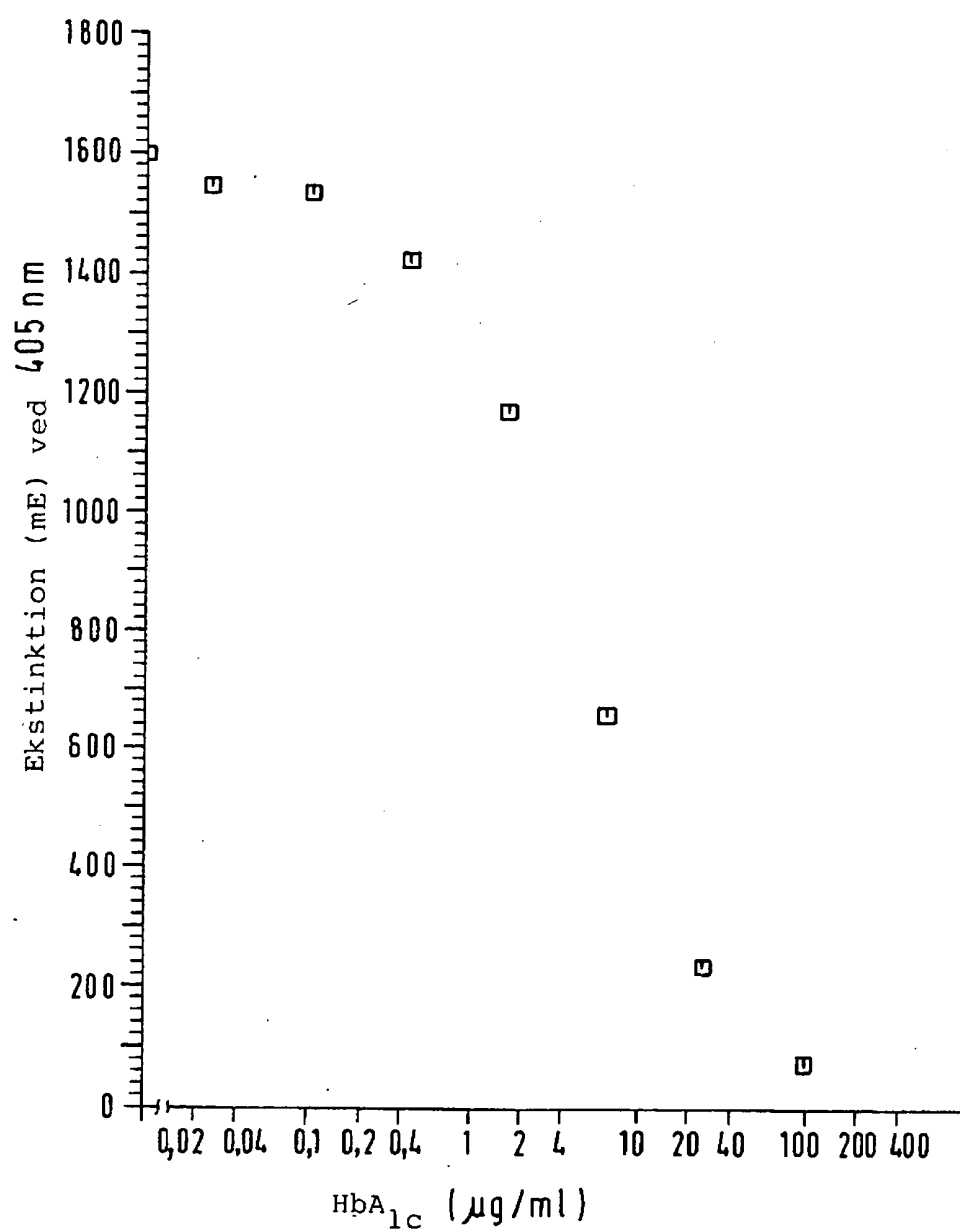


Fig. 2

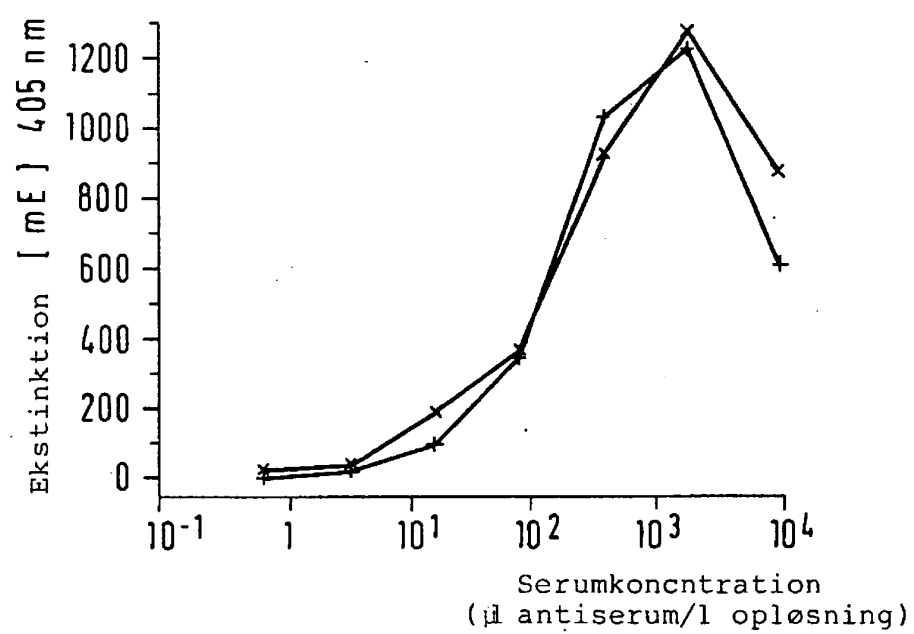
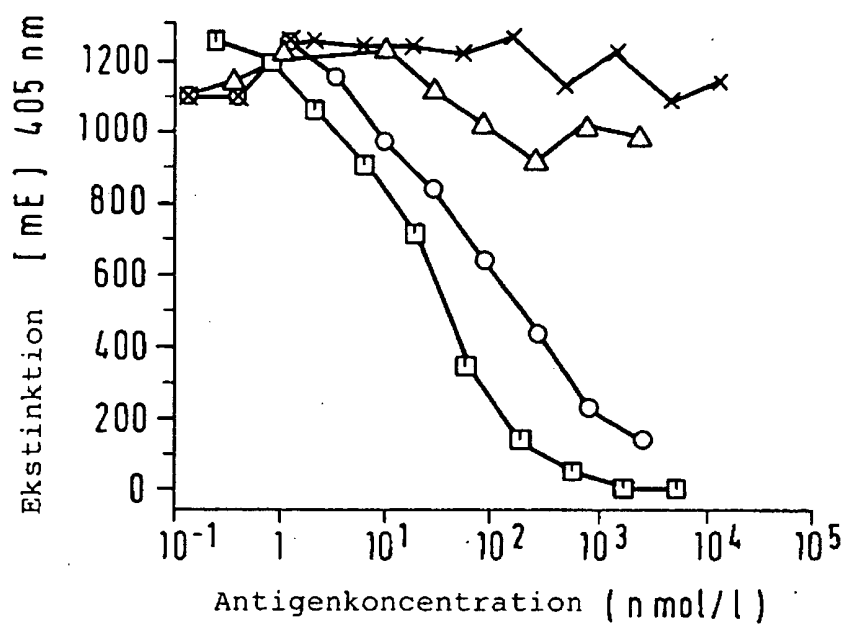


Fig. 3



- Kurve 1
- × Kurve 2
- Kurve 3
- △ Kurve 4