
Octrooiraad



Nederland

⑩ A Terinzagelegging ⑪ 8103113

⑲ NL

- ⑤4 **Verbetering in de werkwijze voor het bereiden van een Limuluslysaat.**
- ⑤1 Int.Cl³: G01N 33/50, C12Q 1/00.
- ⑦1 Aanvrager: Mallinckrodt, Inc. te St. Louis, Missouri, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8103113.
- ②2 Ingediend 26 juni 1981.
- ③2 Voorrang vanaf 27 juni 1980, 14 april 1981.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 163456 , 254233 .
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 18 januari 1982.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Betr.: Verbetering in de werkwijze voor het bereiden van een Limulus-lysaat.

De uitvinding betreft een werkwijze voor het verbeteren van de gevoeligheid van Limulus-amoebocyte-lysaat (hieronder veelal aangeduid als LAL of lyaat) voor endotoxine, een verbeterd LAL reagens en het gebruik van een dergelijk LAL reagens.

- 5 Als bekend is, is de LAL proef voor het aantonen van endotoxinen de meest praktische en gevoelige proef voor het bepalen van endotoxinen. Praktische bepalingen gebruiken amoebocyte-lysaat uit Limulus hemolymfe, verkregen uit bepaalde krabben. Dit lyaat wordt gecombineerd met passende tweewaardige kationen, geschikte buffers en andere bestanddelen
- 10 waardoor een LAL reagens wordt gevormd. Dit reagens reageert vervolgens met endotoxine tijdens de proef tot een gel. Producenten van LAL-reagentia ondervinden vaak moeilijkheden bij het produceren van een lyaat met de gewenste gevoeligheid voor het aantonen van endotoxine. De gevoeligheid van preparaat tot preparaat is eveneens verschillend.
- 15 Deze problemen worden tenminste ten dele geweten aan de aanwezigheid van een endogene, ongedefinieerde endotoxine-remstof in het lyaat (hieronder veelal aangeduid als remstof).

- Weinig is bekend omtrent de aard van de remstof of zijn in vivo rol in de betreffende krab. Electroforetische onderzoeken duiden
- 20 erop, dat de remstof een lipoproteïne met hoog molecuulgewicht is. Deze kan in de amoebocyte de taak hebben het coagulatie-verdedigings-mechanisme te regelen. Dat de remstof een membraancomponent kan zijn, die vrijkomt bij een cellysis, is eveneens mogelijk. De onzekerheid omtrent de rol en de herkomst van de remstof wordt onderstreept door het
 - 25 feit, dat het mechanisme van de remming nog onduidelijk is. De remstof blokkeert mogelijk de enzymatische reactie, hetzij door associatie met het enzym zelf of met het endotoxine of beide. Evenals enige andere serine-proteasen wordt het pro-klontvormende enzym vermoed een complex te vormen met calcium en glycerofosfolipide. Endotoxine zelf
 - 30 is lipoidaal, een remstof met lipoproteïnekarakter zou dus sterk compatibel zijn met beide componenten.

Dat de remstof een lipoproteïne is wordt ondersteund door zijn gevoeligheid voor chloroform. Als beschreven in Amerikaans octrooischrift 4.107.077 wordt de gevoeligheid van LAL aanmerkelijk verbeterd wanneer

het lysaat wordt behandeld met een organisch oplosmiddel, zoals chloroform, waardoor de remstof uit het lysaat wordt neergeslagen. De waterfase wordt dan vervolgens gewonnen en verwerkt tot een LAL-reagens.

5 Tegenwoordig is de bovenweergegeven oplosmiddelextractie de snelste methode voor het verbeteren van de LAL-gevoeligheid. Ongelukkigerwijze heeft deze methode diverse nadelen. Vanwege de absolute eis dat endotoxine-vrije voorwaarden gedurende de gehele lysaatproduktie moeten worden gehandhaafd, verhoogt een ingewikkelde extractieprocedure en een daaropvolgende centrifugeringsbehandeling de waarschijnlijkheid omtrent falen van het produkt. Als gezegd in het octrooi-
10 schrift verlaagt de oplosmiddelbehandeling de lysaatstabiliteit, zodat de produktie snel en in de koude moet verlopen. Ook bevat het neerslag, verwijderd uit het lysaat door de oplosmiddelbehandeling, aanmerkelijke hoeveelheden coagulogene, het benodigde stollingsproteïne. Handhaving
15 van een passend eiwitgehalte is een eis voor een goede gelvorming tijdens de endotoxineproef. Kennelijk is onder de laatste omstandigheden een regeling van de reagensgevoeligheid moeilijk. Chloroform, het meest gebruikte oplosmiddel, is bekend vanwege zijn ongewenste effecten op de mens. De gezondheid en de veiligheid van het produktiepersoneel
20 komen daarom enigszins in gevaar. Het is duidelijk, dat een procédé dat de genoemde nadelen vermijdt en de gevoeligheid in de gewenste mate verbetert een duidelijke verbetering zal vormen.

De uitvinding betreft derhalve een verbeterde werkwijze voor een eenvoudige en snelle verbetering van de gevoeligheid van LAL.

25 Volgens de uitvinding verkrijgt men een werkwijze voor het behandelen onder lysaat behandelende voorwaarden van LAL met verlaagde gevoeligheid voor endotoxine door de aanwezigheid van een endogene remstof, met een verhogende hoeveelheid van een lysaatgevoeligheid verhogend middel waardoor de remstof geheel of gedeeltelijk wordt
30 geneutraliseerd, en daarmee de LAL gevoeligheid voor endotoxine wordt verhoogd.

Er bestaan bepaalde minimale criteria, volgens welk men de LAL-gevoeligheid verhogende eigenschappen kan omschrijven, d.w.z. de LAL-gevoeligheid verhogende middelen volgens de uitvinding moeten bezitten
35 a) het vermogen de lysaatgevoeligheid tot een passende gevoeligheid

te verhogen, b.v. tot het dubbele of meer, b) het vermogen depyrogenering te weerstaan, d.w.z. verwijdering of vernietiging van endotoxine, door ultrafiltratie of een zuurbehandeling bij een pH beneden 5 of een basebehandeling boven pH 8, c) het vermogen te worden gesteriliseerd, b.v. door 15 minuten verhitten bij 2 at en 121°C, d) het vermogen waterige oplossingen van ca. 2% bij 25°C te vormen, e) het vermogen binnen het pH-traject van ca. 6,0 tot 9 te functioneren, f) het vermogen verenigbaar te zijn met buffers en andere bestanddelen in het LAL reagens en g) het vermogen verenigbaar te zijn met LAL en bij zijn reactie met endotoxinen.

Dergelijke versterkende middelen omvatten amfotere oppervlakte-actieve middelen die zowel een anionogene als kationogene groep in hun structuur bezitten. Voorbeelden zijn de sulfobetainen met de formule A van het formuleblad, waarin R_1 een alkyleengroep met 1-4 koolstofatomen, Y een niet storende chemisch geschikte substituent is in de vorm van (1) waterstof, (2) al of niet gesubstitueerd alkyl, b.v. met 1-4 koolstofatomen, zoals methyl, ethyl, propyl of hydroxyl enz.; R_2 en R_3 gesubstitueerde of niet gesubstitueerde alkylgroepen met 1-4 koolstofatomen, b.v. methyl, ethyl, propyl, hydroxyethyl, hydroxymethyl, hydroxypropyl enz., n is 0 of 1, indien $n=0$, R_4 al of niet gesubstitueerd alkyl, b.v. met 8-18 koolstofatomen, en indien $n=1$, R_4 een alkyleengroep met 1-6 koolstofatomen, en R_5 al of niet gesubstitueerd alkyl, b.v. met 8-18 koolstofatomen voorstellen.

De uitdrukking "alkyleen" omvat polymethyleengroepen en andere tweewaardige, verzadigde alifatische groepen die recht of vertakt kunnen zijn.

De onderhavige sulfobetainen zijn op zichzelf bekend en beschreven als zwitterion-bevochtigingsmiddelen.

De bereiding van dit soort verbindingen is b.v. beschreven door Fernley in de J. Am. Oil Chemists Soc., 55, blz. 98-103 van januari 1978 en in Amerikaans octrooischrift 3.280.179.

Bij voorkeurs-sulfobetainen hebben R_2 en R_3 de betekenis van methyl. Tevens is R_1 bij voorkeur propyleen.

Een type sulfobetainen, dat kan worden gebruikt heeft een structuur, waarin $n=0$ is en R_4 een alkylgroep met 8-18 koolstofatomen,

bij voorkeur met een rechte keten. Voor deze sulfobetainen is een gunstige bron voor de R_4 -component een talgvetalcohol bestaande uit een mengsel van diverse ketenlengten, b.v. ca. 66% C_{18} , 30% C_{16} en 4% C_{14} en andere. Een andere geschikte bron is de middenfractie van
5 gedestilleerde kokosnoot-vetalcohol, die bestaat uit een mengsel van diverse ketenlengten met b.v. ca. 66% C_{12} , 23% C_{14} , 9% C_{16} en 2% C_{10} .

Specifieke sulfobetainen met de bovenweergegeven structuur, waarin n is 0, zijn weergegeven in Amerikaans octrooischrift 3.539.521. Een middel van dit type dat bijzondere voorkeur verdient
10 is N-tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propaansulfonaat, dat in de handel wordt gebracht door Calbiochem-Behring Corporation onder het merk ZWITTERGENT 3-14.

Een ander type sulfobetainen, die kunnen worden gebruikt bezitten de bovenweergegeven structuur waarbij $n=1$ en R_4 is een alkyleen-
15 groep met 1-6 koolstofatomen. In deze sulfobetainen, waarin n gelijk is aan 1, is R_5 een alkylgroep met 8-18 koolstofatomen. Bij voorkeur is R_5 rechteketenvormig. Als eerder gezegd zijn geschikte bronnen voor dit soort alkylgroepen met 10-18 koolstofatomen talgvetalcohol en kokosnoot-vetalcohol.

20 Specifieke sulfobetainen met de structuur waarin n is 1, zijn eerder genoemd in Amerikaans octrooischrift 3.280.179.

Sulfobetainen met bijzondere voorkeur in preparaten volgens de uitvinding zijn 3-(N,N-dimethyl-N-acylamidopropylammonio)-2-hydroxypropaan-1-sulfonaten, waarin de acylgroep is afgeleid van talgvetalcohol of kokosnootvetalcohol, waarbij kokosnootvetalcohol de voorkeur verdient. Deskundigen zullen onderkennen, dat bij de normale bereiding van deze derivaten van talg- of kokosnootvetalcoholen, een mengsel van sulfobetainen met wisselende koolstofketenlengten voor de acylgroepen zullen ontstaan. Als eerder gezegd, bevatten deze vetalcoholen voor
30 het grootste gedeelte koolstofketenlengten die acylgroepen opleveren met het gewenste aantal koolstofatomen, d.w.z. tussen 8 en 18 koolstofatomen. Zo zijn de mengsels verkregen uit talg- of kokosnootvetalcoholen bruikbaar voor het verschaffen van de passende sulfobetainen voor de onderhavige preparaten. Een materiaal met bijzondere voorkeur voor toe-
35 passing in het onderhavige preparaat is N-kokosamidopropyl-N,N-di-

methyln-2-hydroxypropylsulfobetaine, b.v. LONZAINES, van Lonza, Inc., een ander voorbeeld is VARION CAS van Sherex Chemical Company.

Andere amfotere oppervlakteactieve middelen omvatten de N-langketenvormige alkylaminocarbonsuren met de formule B, de N-langketenvormige alkyliminodicarbonzuren met de formule C en de N-langketenvormige alkyl- of amidobetaines met de formule D, waarin R_1, R_2, R_3, R_4, Y en n de boven weergegeven betekenis bezitten, M waterstof of een zoutvormend metaal is en Y' de zelfde betekenis bezit als Y in formule A. Y en Y' kunnen gelijk of verschillend zijn. Voorbeelden voor specifieke amfotere middelen zijn N-alkyl-beta-aminopropionzuur, N-alkyl-beta-iminodipropionzuur en N-alkyl-N,N-dimethylglycine; de alkylgroep kan b.v. zijn afgeleid van kokosvetalcohol, laurylalcohol, myristylalcohol (of een lauryl-myristylmengsel), gehydrogeneerde talgalcohol, cetylalcohol, stearylalcohol of mengsels van dit soort alcoholen. De gesubstitueerde aminopropion- en iminodipropionzuren worden vaak in de vorm van de natrium-of andere zoutvormen verkocht, die eveneens bij de uitvinding kunnen worden toegepast. Specifieke voorbeelden omvatten cocobetaine van Witco Chemical Corporation met de naam EMCOL CC 37-18; kokosamidopropylbetaine van Lonza Inc. en Sherex Chemical Company onder de namen LONZAINES CO en VARION CADG; natrium N-kokos-beta-aminopropionaat van Henkel met de naam DERIPHAT 151; dinatrium N-lauryl-beta-iminodipropionaat van Henkel Corporation onder de naam DERIPHAT 160 en dinatrium N-talg-beta-iminodipropionaat van Henkel Corporation met de naam DERIPHAT 154.

Voorbeelden van andere amfotere middelen zijn de vetimidazolinen zoals verkregen door een reactie van een langketenvormig vetzuur (b.v. met 10-20 koolstofatomen) met diëthyleentriamine en monohalogeencarbonzuren met 2-6 koolstofatomen, b.v. 1-kokos-5-hydroxyethyl-5-carboxy-methylimidazoline.

Specifieke voorbeelden omvatten kokosimidazoline met de naam AMPHOTERGE K-2 van Lonza Inc., caprinedicarboxyimidazoline; AMPHOTERGE KJ2 van Lonza en kokosdicarboxyimidazoline gemengd met gesulfateerde bevochtigingsmiddelen onder de naam AMPHOTERGE 2 WAS MOD van Lonza, Inc.

Andere voorbeelden van verbeterende middelen omvatten anion-

synthetische oppervlaktemiddelen, gewoonlijk verbindingen met hydrofiele en lipofiele groepen in hun molecuulstructuur, welke in een waterig medium ioniseren tot anionen met zowel een lipofiele als een hydrofiele groep. De alkylarylsulfonaten, de alkaansulfaten en gesulfateerde geoxethyleerde alkylfenolen zijn illustratief voor het aniontype van dit soort oppervlakteactieve middelen.

De alkylarylsulfonaten zijn een klasse van synthetische anionactieve middelen, welke kunnen worden weergegeven door de formule E, waarin R_6 een rechte of vertakte koolwaterstofgroep met 1-24 koolstofatomen, tenminste één R_6 met tenminste 8 koolstofatomen, n_1 is 1-3, n_2 is 1-2, Ar een fenyl- of een naftylgroep voorstellen en Y en M dezelfde betekenis bezitten als bij formule B. R_6 kan b.v. methyl, ethyl, hexyl, octyl, tetraoctyl, isoöctyl, nonyl, decyl, dodecyl, octadecyl en dergelijke wezen.

Verbindingen illustratief voor de alkylarylsulfonaten omvatten natriumdodecylbenzeensulfonaat, natriumdecylbenzeensulfonaat, ammoniummethyldodecylbenzeensulfonaat, ammoniumdodecylbenzeensulfonaat, natriumoctadecylbenzeensulfonaat, natriumnonylbenzeensulfonaat, natriumdodecylnaftaleensulfonaat, natriumhetadecylbenzeensulfonaat, kaliumeicosylnaftaleensulfonaat, ethylamineundecylnaftaleensulfonaat en natriumdocosylnaftaleensulfonaat.

De alkylsulfaten zijn een klasse van synthetische anionactieve middelen met de algemene formule F, waarin R_5 en M de betekenis weergegeven bij formule B bezitten.

Verbindingen illustratief voor alkylsulfaten omvatten natriumoctadecylsulfaat, natriumhexadecylsulfaat, natriumdodecylsulfaat, natriumnonylsulfaat, ammoniumdecylsulfaat, kaliumtetradecylsulfaat, diëthanolaminoöctylsulfaat, triëthanolamineöctadecylsulfaat en ammoniumnonylsulfaat.

De gesulfateerde geoxethyleerde alkylfenolen zijn een klasse van synthetische anionactieve middelen met de formule G, waarin A zuurstof, zwavel, een carbonamidogroep, een thiocarbonamidegroep, een carboxylgroep of een thiocarboxylestergroep, z 3-8 en R_5 en M de betekenis bij formule B voorstellen.

Verbindingen illustratief voor de gesulfateerde geoxethyleerde

alkylfenolen zijn ammoniumnonylfenoxy-tetraethyleenoxysulfaat, natriumdodecylfenoxytriethyleenoxysulfaat, ethanolaminedecylfenoxy-tetraethyleenoxysulfaat en kaliumoctylfenoxytriethyleenoxysulfaat.

Andere voorbeelden van LAL versterkende middelen omvatten non-
5 ionogene oppervlakteactieve middelen, die ruim kunnen worden beschreven als verbindingen die niet iononiseren maar hydrofiele eigenschappen verkrijgen van een geoxygeneerde zijketen, zoals polyoxyethyleen en waarvan het lipofiele deel van het molecuul afkomstig kan zijn van vetzuren, fenol, alcoholen, amiden of aminen. De verbindingen
10 worden gewoonlijk bereid door een reactie van een alkyleenoxyde, zoals ethyleenoxyde, butyleenoxyde, propyleenoxyde e.d. met vetzuren, rechte of vertakte alcoholen met een of meer hydroxylgroepen, fenolen, thiofenolen, amiden en aminen, welke polyoxyalkyleenglycoëthers en esters, polyoxyalkyleenalkylfenolen, polyoxyalkyleenthiofenolen,
15 polyoxyalkyleenamiden e.d. vormen. Gewoonlijk wordt bij voorkeur ca. 3 tot 30, liefst 10 tot 30 mol alkyleenoxyde per mol vetzuur, alcohol, fenol, thiofenyl, amide of amine omgezet.

Illustratief voor dit soort nonionogene middelen zijn de producten verkregen uit een reactie van alkyleenoxyden met een alifatische
20 alcohol met 8-18 koolstofatomen, zoals octyl, nonyl, decyl, octadecyl, dodecyl, tetradecyl e.d.; met monoësters van hexa-alcoholen, waarvan de estergroep 10-20 koolstofatomen telt, zoals sorbitanmonolauraat, sorbitanmonoöleaat en sorbitanmonopalmitaat; met een alkylfenol, waarin de alkylgroep 4-20 koolstofatomen telt, zoals butyl, dibutyl, amyl,
25 octyl, dodecyl, tetradecyl e.d.; en met een alkylamine, waarin de alkylgroep 1-8 koolstofatomen telt.

Verbindingen die illustratief zijn voor synthetische nonionogene middelen omvatten de producten verkregen uit een condensatie van
ethyleenoxyde of propyleenoxyde met de volgende stoffen: propyleen-
30 glycol, ethyleendiamine, diethyleenglycol, dodecylfenol, nonylfenol, tetradecylalcohol, N-octadecyldiethanolamide, N-dodecylmonoëthanolamide, polyoxyethyleen-(20)-sorbitanmonoöleaat (TWEEN 80) en polyoxyethyleen-(20)-sorbitanmonolauraat (TWEEN 20).

Andere nonionogene middelen omvatten langketenvormige tertiaire
35 amineoxyden met de formule H, waarin R_5 dezelfde betekenis bezit als

bij formule A en R_7 en R_8 methyl of ethyl voorstellen. De pijl in de formule is een gebruikelijke weergave van een semi-polaire binding. Voorbeelden van aminoxyden die geschikt zijn voor de uitvinding omvatten dimethyldodecylaminoxyde, dimethyloctylaminoxyde, dimethyldecylaminoxyde, dimethyltridecylaminoxyde en dimethylhexadecylaminoxyde.

Kationactieve middelen kunnen eveneens worden gebruikt als LAL-versterkende middelen. Dergelijke middelen zijn oppervlakteactieve stoffen met een hydrofobe organische groep en een kationogene oplosbaarmakende groep. Karakteristieke kationogene oplosbaarmakende groepen zijn amine- en quaternaire groepen. Dergelijke kationogene oppervlakteactieve middelen kunnen worden weergegeven door de formule I van het formuleblad, waarin R_5 , Y en Y' de betekenis bij formule C bezitten. Een voorbeeld is QUATERNARY O van Ciba-Geigy.

Andere voorbeelden van geschikte synthetische kationogene middelen omvatten de diaminen, zoals die met de formule J, waarin R_9 een alkylgroep met ca. 12-22 koolstofatomen, zoals N-2-aminoethylstearylamine en N-2-aminoëthylmyristylamine voorstelt; amide-houdende aminen zoals die met de formule K, zoals N-2-aminoethylstearylamide en N-aminoethylmyristylamide; quaternaire ammoniumverbindingen, waarbij een van de groepen gebonden aan het stikstofatoom een alkylgroep is met 1-3 koolstofatomen, waarbij 1-3 alkylgroepen inerte substituenten kunnen bevatten, zoals fenylgroepen en waarin een anion aanwezig is, zoals een halogeen, acetaat, methylsulfaat enz. Karakteristieke quaternaire ammoniumverbindingen zijn ethyl-dimethylstearylammoniumchloride, benzyldimethylstearylammoniumchloride, benzyldimethylstearylammoniumchloride, trimethylstearylammoniumchloride, trimethylcetylammoniumbromide, dimethylethyl-dilaurylammoniumchloride, dimethylpropylmyristylammoniumchloride en de overeenkomstige methosulfaten en acetaten.

Andere geschikte kationogene middelen zijn die met de formule L van het formuleblad, waarin R_5 de betekenis heeft als bij formule A en elke a een getal is van 1 tot 15. Een voorbeeld is het polyethyleenglycolamine van gehydrogeneerde talg, waarin R_5 het talgradicaal is en a+a een gemiddelde waarde bezit van 5. Een dergelijk materiaal wordt verkocht door Ciba-Geigy onder de naam BINA COBA 3001.

Als gezegd wordt het lysaat versterkend middel in versterkende

hoeveelheden gebruikt, d.w.z. voldoende voor het geheel of gedeeltelijk neutraliseren van de endogene endotoxineremstof in het lysaat. Meestal bedraagt deze hoeveelheid 0,001 tot 1 gew.%, liefst 0,01- 0,5 gew.% berekend op het totale volume van het lysaat. Veelal zullen grotere
5 hoeveelheden van een versterkend middel het vermogen van LAL storen om tijdens de proef met endotoxine te reageren.

LAL kan worden bereid volgens de methoden die b.v. zijn beschreven in het Britse octrooischrift 1.522.127.

B.v. wordt de hemolymfe van gezonde exemplaren van Limulus
10 polyphemus opgevangen in een anti-coagulerende fysiologische zoutoplossing, die b.v. is beschreven door Levin en Bang in "Clottable Protein in Limulus: Its Localization and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin", Thromb. Diath. Haemorrh. 19, 186-197 (1968). De amoebocyten worden opgevangen en gewassen met de anticoagulerende zoutoplossing,
15 waarmee de amoebocyte door centrifugeren van het anticoagulans wordt gescheiden.

De geïsoleerde amoebocyten worden vervolgens in water gesuspenseerd en de osmotische verbreking van de cellen vervolledigd door mechanisch roeren. De celstukjes wordt uit het lysaat door centrifugeren verwijderd en de lysaatfracties samengevoegd en bij 0-4°C op-
20 geslagen.

Ter vorming van het LAL reagens worden de bovengenoemde LAL fracties gewoonlijk gebuffered op een passend pH-traject, b.v. 5,5-8,5, liefst 6,5-7,5 met behulp van een passende buffer, zoals tris(hydroxymethyl)aminomethaan, tris(hydroxymethyl)aminomethaanmaleaat, 1,4-piperazine-
25 zinediëthaansulfonzuur, morfolinopropaansulfonzuur, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethaansulfonzuur, triëthanolamine, imidazool en tris(hydroxymethyl)-imidazool. Vervolgens kan het LAL reagens worden onderverdeeld in serumkolfjes, die b.v. 1,2 tot 5,2 cm³ van de oplossing
30 bevatten en vervolgens worden gelyofiliseerd. Normaal worden na deze lyofilisatie de flesjes verzegeld en bij 1-5°C opgeslagen.

Gewoonlijk wordt volgens de uitvinding het LAL behandeld door toevoeging van de gevoeligheidsverhogende fractie, nadat het LAL is gescheiden van de amoebocyte celstukjes. Meestal wordt de stof toegevoegd
35 vóór of tijdens het bereiden van het LAL reagens, b.v. gelijktijdig met

de buffer en andere bestanddelen.

De gevoeligheid van het LAL reagens jegens endotoxine wordt verder verhoogd door toevoeging van lage concentraties aan twee- en éénwaardige kationen. Calcium- en mangaanionen zijn de voorkeurs-tweewaardige ionen, hoewel andere aardalkaliïonen, zoals magnesium- en strontiumionen alsmede andere tweewaardige ionen kunnen worden gebruikt. Magnesium- en strontiumionen verdienen eveneens een zekere voorkeur. Natriumionen zijn de voorkeurs-éénwaardige ionen, hoewel andere éénwaardige ionen, speciaal alkali-ionen, zoals lithiumionen, kunnen worden gebruikt. De chloriden (CaCl_2 , NaCl , enz.) zijn gebruikelijke bronnen voor deze ionen, hoewel ook andere zouten kunnen worden toegepast. Bij voorkeur worden deze electrolyten toegevoegd in endotoxinegevoeligheids-verhogende hoeveelheden, b.v. voor het divalente kation (b.v. Ca^{+2}), zal de concentratie liggen tussen 0,0001 en 0,4 molair en voor het éénwaardige kation (b.v. Na^+) zal de concentratie ongeveer 0,01-0,4 molair bedragen.

Het LAL reagens kan tevens gebruikelijke hulpstoffen en stabilisatoren, zoals lactose, bevatten. Deze hulpstoffen worden bij toepassing toegevoegd in ondergeschikte hoeveelheden maar voldoende om het beoogde doel te bereiken zonder dat de gewenste eigenschappen van het LAL reagens schade ondervinden.

Al deze handelingen worden uitgevoerd onder lysaat-behandelde voorwaarden zodat het eindprodukt steriel is en vrij van endotoxine. Methoden voor het garanderen van vrijheid van endotoxinen zijn bekend. B.v. kunnen anorganische toeslagstoffen (CaCl_2 , NaCl enz.) endotoxine-vrij worden gemaakt door de droge zouten op 250°C en wel gedurende tenminste 120 minuten te verhitten. Organische toeslagstoffen moeten vanwege hun smeltpunten gewoonlijk worden opgelost, zuur worden gemaakt ($\text{pH} \leq 5$) of alkalisch worden gemaakt ($\text{pH} > 9$) waarna de verkregen oplossing 30-60 minuten of meer bij 121°C moet worden geautoclaveerd om eventuele endotoxinen te vernietigen.

Een verder aspect van de uitvinding betreft een LAL reagens met als essentiële onderdelen een waterige dispersie van LAL, een LAL gevoeligheidsverhogend middel als boven beschreven in een lysaat versterkende hoeveelheid, en een passende buffer, eveneens boven beschreven.

Eventueel kunnen de bovenbeschreven monovalente en divalente kationen in dit preparaat worden verwerkt om de gevoeligheid van het lysaat verder te verhogen.

5 Gewoonlijk is het lysaat in het onderhavige reagens in een endotoxine bepalende hoeveelheid aanwezig, d.w.z. een hoeveelheid die voldoende is om endotoxine bij een hieropvolgende LAL proef op endotoxinen, aan te tonen, gewoonlijk is dit een hoeveelheid, die ca. 0,007 tot 0,5 ng/cm³, liefst ca. 0,007 tot 0,05 ng/cm³ FDA Reference Endotoxinen EC-2 aantoonst. Het bovengenoemde LAL reagens kan worden
10 gelyofiliseerd, hetgeen de voorkeur verdient.

Volgens de uitvinding kan het LAL reagens worden gebruikt voor het bepalen van endotoxine onder endotoxine bepalende voorwaarden volgens de gebruikelijke procedure, als beschreven in Brits octrooi-schrift 1.522.127.

15 De volgende voorbeelden lichten de uitvinding nader toe. Alle delen zijn in gewicht/volume weergegeven, tenzij anders gezegd.
Bereiding van Limulus lysaat.

Limulus lysaat werd bereid door modificatie van de procedure beschreven door Levin en Bang (Thromb. Diath. Haemorrh. 19, 186 (1969)).
20 De krab Limulus polyphemus uit de Atlantische Oceaan werd van zijn hemolymfe (ca. 500 cm³) ontdaan door een hartpunctie met een naald, waarbij deze hemolymfe werd opgevangen in een endotoxinevrije glazen centrifugehouder van 1 liter, waarin 500 cm³ 0,125% N-ethylmaleïmide in endotoxinevrije 10%'s zoutoplossing aanwezig was, en die was verwarmd
25 op 42°C. De centrifugehouder met hemolymfe-anticoagulansoplossing werd 8 minuten op 42°C gehouden en daarna 10 minuten bij 150 x g gecentrifugeerd. De bovenstaande plasmaoplossing werd afgeschonken en de amoebocyte pellet hersuspenderd in anticoagulansoplossing. De cellen werden opnieuw afgecentrifugeerd. De opeengepakte cellen werden ver-
30 volgens hersuspenderd in 0,9% pyrogeenvrije zoutoplossing en overgebracht in een gedepyrogeniseerde 50 cm³ centrifugebuis van plastic. De gewassen cellen werden opnieuw bij 150 x g gecentrifugeerd. Na decanteren van de zoutoplossing werden de opeengepakte amoebocyten verbroken door toevoeging van pyrogeenvrij injectiewater in een hoe-
35 veelheid van 7 cm³ water op 3 cm³ opeengepakte cellen. Na mengen op een

vortex gedurende 10-15 seconden werden de gelyseerde cellen 24 uren bij 1-5°C opgeslagen. De celstukjes werden door bij 1500 x g te centrifugeren gedurende ca. 15 minuten gesedimenteerd. Het aldus verkregen lysaat werd afgeschonken en bij 0-4°C opgeslagen. De cel-
5 stukjes werden weggegooid.

Bereiding van standaard-endotoxineoplossingen.

Standaardoplossingen van de Food and Drug Administration reference standaard endotoxine Lot EC-2 werden bereid in pyrogeenvrij water voor injectie.

10 Reconstitutie van 1 µg endotoxine in een flesje met 10 cm³ water resulteerde in een initiële concentratie van 0,1 µg/cm³. Het flesje werd 1 uur op een schudmachine geschud. Serieverduunningen werden bereid ter bereiding van de volgende endotoxineconcentraties: 10nm/cm³, 1ng/cm³, 500pg/cm³, 250pg/cm³, 125pg/cm³, 62,5og/cm³,
15 31,25pg/cm³, 15,6pg/cm³ en 7,8pg/cm³. Eenmaal bereid werden deze endotoxineoplossingen tot 48 uur opgeslagen en daarna weggegooid. Andere endotoxinestandaarden die gebruikt werden waren oplossingen van FDA Reference
20 Endotoxine Lot No. 1 uit Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli endotoxine Lot 071857 (Difco) en een reformulering van reference Lot EC-2, bereid in ons laboratorium. Endotoxinestandaardoplossingen bereid uit E. coli Lot 071857 endotoxine hadden de volgende concentraties: 6,25, 12, 5, 50, 75, 100, 150 en 200 pg/cm³.

Lysaat proefprocedure

25 Lysaatverduunningen van 25 tot 70% werden bereid in een 0,1 M buffer met pH 7,0 die gewoonlijk tris was, t.w. tris(hydroxymethyl)aminomethaan. Andere toe te passen buffers omvatten imidazool, trisimidazool, triëthanolamine, trismaleaat, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethaansulfonzuur (HEPES), 1,4-piperazinediëthaansulfonzuur (PIPES),
30 en morfolinopropaansulfonzuur (MOPS).

Ter bepaling van de gevoeligheid van het lysaat werd 0,1 cm³ van elk van de endotoxineoplossingen gecombineerd met 0,1 cm³ lysaat in gedepyrogeniseerde 10x75mm schroefdop-glazen-buizen en 1 uur bij 37°C geïncubeerd. De resultaten werden bepaald door elke buis voorzichtig
35 180° om te keren. Een klont die in tact bleef na deze omkering

duidt op een positieve endotoxineproef.

Bereiding en depyrogenisatie van oplossingen van oppervlakteactieve middelen.

- Opslag LAL gevoeligheidsverhogende oplossingen werden bereid in concentraties tot 10% actieve stof in waterige oplossing. Meestal werden concentraties bereid van 1%. Hoewel de procedure in hoeveelheden van middel tot middel varieerde, werd genoeg materiaal opgelost in 50 cm³ waterige oplossing om de gewenste concentratie te verkrijgen bij verdunning op 100 cm³. De oplossing bevatte tevens 7,5 cm³ 0,05 M tris(hydroxymethyl)aminomethaan (TRIZMA BASE van Sigma Chemical Co.) en 1 cm³ 2 N NaOH tot een uiteindelijke pH $\geq$ 11. Het middel in de basische oplossing werd 12 uur of meer bij 0-4°C opgeslagen om een volledige depyrogenisatie te garanderen. Nadat de oplossing op ca. pH 8 was gebracht werd deze 15 minuten of langer bij ca. 121°C geautoclaveerd. De pH werd uiteindelijk op 7,0 $\pm$ 0,5 gebracht. De concentratie van het middel werd berekend en de verdunning geregeerd op de uiteindelijk gewenste concentratie. Base-gevoelige middelen worden gedepyrogeniseerd door een zuurbehandeling, waarbij HCl en trisbuffer worden gebruikt i.p.v. natronloog en TRIZMA BASE.
- 20 Toevoeging van de middelen aan het lysaat.

- Middeloplossingen, bereid als bovenbeschreven, werden tijdens de verdunning met buffer aan het lysaat toegevoegd. De hoeveelheid varieerde naargelang van het gebruikte middel maar de concentratie van alle onderzochte middelen lag tussen 0,001 en 1,0% berekend op de uiteindelijke concentratie in de lysaatoplossing. De volgorde van toevoeging van de bestanddelen wijzigde niets aan de resulterende lysaatgevoeligheid.

Voorbeeld I

- Het LAL gevoeligheidsversterkende middel, ZWITTERGENT TM 3-14, N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propaansulfonaat, een sulfobetaine van Calbiochem-Behring Corporation, werd als boven beschreven gedepyrogeniseerd en verdund tot een uiteindelijke concentratie van 1 gew.%. Lysaat lot 9CZC werd bereid als een 50%'s verdunning met 0,1 M trismaleaatbuffer pH 7,0. Toevoeging van het versterkende middel vond plaats tot een uiteindelijke concentratie in het lysaat van

0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075 en 0,1 gew.%. Een controlemonster bevatte pyrogeenvrij water i.p.v. het oppervlakteactieve middel. De lysaatverdunningen werden een nacht bij 0-4°C opgeslagen en de volgende dag onderzocht met een speciaal geformuleerde EC endotoxinereeks verdunningen (aangeduid EC). De resultaten zijn weergegeven in tabel A en geven zowel het effectieve concentratietraject voor het versterkende middel aan als de totale versterking in lysaatgevoeligheid jegens endotoxine vergeleken met het controlelysaat.

Tabel A

Monster	versterkend middel(%)	lysaatgevoeligheid ^x
Controle	0	500
LAL plus	0,005	1,000.0
15 versterkend middel	0,01	500.0
	0,02	31,2
	0,05	10,000.0
	0,075	10,000.0
	0,10	10,000.0

^x Uitgedrukt als de laagste endotoxineconcentratie in pg/cm³ die nog een positieve klontproef oplevert.

Voorbeeld II

Standaard endotoxineoplossingen werden bereid uit E.coli endotoxine 071857, FDA Reference Endotoxin EC-2 en K. pneumoniae FDA reference Lot. No. 1. Het lysaat werd verdund met 0,1 M tris buffer pH 7,0 en met versterkend middel ZWITTERGENTTM 3-14, en wel tot een 30% lysaatverdunning met daarin 0,02% ZWITTERGENT 3-14. Het middel werd bij het controlemonster door water vervangen. De lysaatproef werd uitgevoerd met elke endotoxine-verdunningsreeks.

Tabel B

Endotoxine	monster	Lysaatgevoeligheid	x
<u>E. coli</u>	Controle LAL	75,0	
	versterkend middel	25,0	
5 FDA Reference EC-2	controle	500,0	
	LAL versterkend middel	62,5	
FDA <u>K. pneumonia</u>	controle LAL	1,000.0	
	versterkend middel	125.0	

x Uitgedrukt in de laagste endotoxineconcentratie (pg/cm^3) die nog
 10 een positieve klontproef oplevert.

Voorbeeld III

22 commercieel verkrijgbare LAL versterkende middelen werden
 onderzocht op hun effecten op de lysaatgevoeligheid jegens endotoxine.
 Oplossingen van elke stof werden bereid en toegevoegd aan lysaat Lot
 15 9FI tot uiteindelijke concentraties tussen 0,001 en 0,20 gew.%.
 Lysaatmonsters werden vervolgens beproef met gereformuleerd FDA
 EC endotoxine (EC). In tabel C zijn de middelen weergegeven in volg-
 orde van aflopend effect. De meest effectieve concentraties beproefd
 in het lysaat en de overeenkomende lysaatgevoeligheden zijn weerge-
 20 geven. De gevoeligheid van het controlelysaat (50% verdunning) zonder
 enig middel is eveneens weergegeven.

Tabel C

handelsnaam	bron	aand.middel	Effectieve concentratie %	^a lysaat ge- voeligh.
Emwitergent 3-14	Calbiochem-Behring	Amphoteer	0,02	15,6
Varion CADG	Sherex Chemical Company, Inc.	amphoteer	0,02	15,6
Lonzaine CO	Lonza Inc.	amphoteer	0,02	15,6
Lonzaine CS	Lonza Inc.	amphoteer	0,02	15,6
Varion CAS	Sherex Chemical Company, Inc.	amphoteer	0,02	31,2
Emcol CC38-17	Witco Chemical Corporation	amphoteer	0,02	31,2
Deriphat 151	Henkel Inc. USA	^b amphoteer	0,01	31,2
Bina Coba 3001	Ciba-Geigy Corporation	cationogeen	0,01	31,2
Barlox 12	Lonza Inc.	nonionogeen	0,01	31,2
Quaternary 0	Ciba-Geigy Corporation	cationogeen	0,002	31,2
polystep B-5	Stepan Chemical Company	anionogeen	0,001	31,2
Tween 80	ICI Americas Inc.	nonoionogeen	0,20	62,5
Amphoterger K-2	Lonza Inc.	amphoteer	0,02	62,5
Lodyne S-100	Ciba-Geigy Corporation	amphoteer	0,02	62,5
Deriphat 154	Henkel INC. USA	^b amphoteer	0,002	62,5
Polystep A-15	Stepan Chemical Company	anionogeen	0,002	62,5
Amphoterger KJ-2	Lonza Inc.	amphoteer	0,001	62,5
Deriphat 160	Henkel Inc. USA	^b amphoteer	0,02	62,5

vervolg tabel C

Polystep A-17	Stepan Chemical Company	anionogeen	0,001	62,5
amphoterge WAS	Lonze Inc.	amphoteer	0,001	125,0
Dianol RSX	Quaker Chemical Corporation	anionogeen	0,002	250,0
Tween 20	ICI Americas Inc.	nonionogeen	0,002	250,0
Controle lysaat				125,0

^a Uitgedrukt in de laagste endotoxineconcentratie (pg/cm³) die nog een positieve klontproef oplevert.

^b Bij pH 7 domineert de anionogene vorm.

Voorbeeld IV

Om te bepalen, dat de verhoogde gevoeligheid waargenomen bij een lysaat behandeld met versterkend middel ook bij lyofilisatie werd behouden, werd een 30%'s verdunning van lysaat in 0,05 M tris -
5 buffer met en zonder 0,02% ZWITTERGENTTM 3-14 (uiteindelijke concentratie in het lysaat) bereid. De lysaatoplossing ($1,2 \text{ cm}^3$) werd verdeeld in elk van 10 cm^3 flesjes. Deze monsters werden bij -35°C bevroren en onder een vacuum van 50μ gelyofiliseerd gedurende een droogtijd van ca. 32 uren. De flesjes werden verzegeld met rubber
10 stoppen en metalen kapjes. Het gevriesdroogde lysaat werd gereconstitueerd met $1,2 \text{ cm}^3$ pyrogeenvrij water voor injectie en vervolgens onderzocht met FDA Reference Endotoxin lot EC-2. Het controlelysaat zonder versterkend middel had een gevoeligheid van $62,5 \text{ pg/cm}^3$. Bij aanwezigheid van een versterkend middel werd de gevoeligheid van
15 het lysaat verdubbeld en wel tot $31,2 \text{ pg/cm}^3$.

Voorbeeld V

Limulus lysaat lot ODH van ongeveer 1 week oud werd bereid als een 40%'s verdunning in 0,05 M tris(hydroxymethyl)aminomethaanmaleaat buffer met pH 7,0 met daarin uiteindelijke concentraties van 0,06 M
20 CaCl_2 en 0,01 M MnCl_2 alsmede 0,03% ZWITTERGENTTM 3-14. Deze oplossing werd verdeeld als $1,2 \text{ cm}^3$ porties in 8 cm^3 flesjes en bij -45°C bevroren waarna onder een 50μ vacuum gedurende ca. 28 uren werd gelyofiliseerd. De flesjes werden gesloten met rubber stopjes en van plastic schroefkapjes voorzien. De gevriesdroogde lysaten werden ge-
25 reconstitueerd met telkens $1,2 \text{ cm}^3$ pyrogeenvrij water voor injectie en onderzocht met FDA Reference Endotoxin lot EC-2. De gevoeligheid van met versterkend middel behandelde gelyofiliseerde lysaten bedroeg 62 pg/cm^3 . Een controle 40%'s verdunning van LAL zonder versterkend middel onderzocht voor lyofilisatie had een gevoeligheid van 1 ng/cm^3 .

30 Voorbeeld VI

Limulus lysaathoeveelheden met een gevoeligheid gelijk of meer dan 500 pg/cm^3 *E. coli* endotoxin LCF werden bereid in de vorm van een 40%'s verdunning in 0,025 M tris(hydroxymethyl)aminomethaanmaleaatbuffer met pH 7,0 met daarin in uiteindelijke concentraties
35 $0,02 \text{ M MgCl}_2$, $0,01 \text{ M SrCl}_2$, $0,01 \text{ M CaCl}_2$ en 0,025% ZWITTERGERNT 3-14.

- Deze oplossing werd in porties van $1,2 \text{ cm}^3$ en $5,2 \text{ cm}^3$ afgevuld in flesjes van 10 cm^3 en bij -50°C bevroren. De monsters werden onder 100μ vacuum gelyofiliseerd gedurende ca. 72 uren. Het gelyofiliseerde produkt werd gereconstitueerd met resp. $1,2 \text{ cm}^3$ of $5,2 \text{ cm}^3$ pyrogeenvrij water voor injectie afhankelijk van het uitgangsvolume van het lysaat. Bij een proef met E. coli endotoxine LCF na de lyofilisatie bedroeg de gevoeligheid van de met versterkend middel behandelde gelyofiliseerde lysaten voor beide monstergrootten 25 pg/cm^3 , vergeleken met een controlegevoeligheid van 500 pg/cm^3 .
- 5

CONCLUSIES:

1. Werkwijze voor het behandelen onder lysaatbehandelende voorwaarden van een *Limulus* amoebocytelysaat met een verminderde gevoeligheid voor endotoxine door de aanwezigheid van een endogene lysaatremstof, met een versterkende hoeveelheid van een lysaatgevoeligheids-versterkend
5 middel met lysaatgevoeligheids-verhogende eigenschappen door gehele of gedeeltelijke neutralisatie van de genoemde lysaatremstof, waardoor de lysaatgevoeligheid voor endotoxine wordt verhoogd, met het kenmerk, dat het lysaatversterkende middel wordt geselecteerd uit de groep bestaande uit
- 10 (I) amfotere oppervlakte-actieve middelen met de formules A, B, C of D, waarin R_1 een alkyleengroep met 1-4 koolstofatomen, Y en Y' waterstof, alkyl of hydroxyalkyl, R_2 en R_3 alkyl of hydroxyalkyl, n 0 of 1, waar-
bij indien n is 0, R_4 alkyl met ca. 8-18 koolstofatomen, indien n
is 1, R_4 een alkyleengroep met 1-6 koolstofatomen, R_5 alkyl met ca.
15 8-18 koolstofatomen en M waterstof, natrium, kalium of ammonium
voorstellen,
(II) anionactieve middelen met de formules E of F van het formuleblad,
waarin R_5 , Y en M de bovenweergegeven betekenis bezitten,
 R_6 een alkylgroep met 8-24 koolstofatomen, n_1 1 t/m 3, n_2 1 t/m 2,
20 en Ar fenyl of naftyl voorstellen,
(III) kationactieve middelen met de formule I, waarin R_5 , Y en Y'
de bovenweergegeven betekenis bezitten en
(IV) nonionogene actieve middelen met de formule H, waarin R_5
de bovenweergegeven betekenis bezit en R_7 en R_8 elk methyl of ethyl
25 voorstellen, alsmede de nonionogene oppervlakteactieve middelen
bestaande uit de groep van de condensatieprodukten van ca. 10-30 mol
ethyleenoxyde met een monoëster van een zeswaardige alcohol met 6 kool-
stofatomen en een estergroep met 10-20 koolstofatomen.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het ver-
30 sterkend middel wordt gekozen uit de groep van de amfotere middelen
met de formule A.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het ver-
sterkende middel aanwezig is in een hoeveelheid van 0,01-0,05 gew. %.
4. Werkwijze volgens conclusie 3, waarin n is 0, R_4 is tetradecyl,
35 R_2 en R_3 elk methyl en R_1 ; trimethyleenvoorstellen.

5. Werkwijze volgens conclusie 3, waarin n is 1, R_4 trimethyleen, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 is $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2$ voorstellen.
6. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het versterkend middel wordt geselecteerd uit de groep van de amfotere middelen met de formule D volgens conclusie 1.
7. Werkwijze volgens conclusie 6, waarbij het versterkend middel aanwezig is in een hoeveelheid van 0,01-0,05 gew. %.
8. Werkwijze volgens conclusie 7, waarin n is 1, R_4 is propyleen, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 methyleen voorstellen.
9. Werkwijze volgens conclusie 7, waarin n is 0, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 methyleen voorstellen.
10. Een *Limulus* amoebocyte lysaatreagens voor het bepalen van endotoxine, bestaande uit een gebufferde waterige dispersie van *Limulus* amoebocyte lysaat aanwezig in een endotoxine bepalende hoeveelheid met een verbeterde gevoeligheid jegens endotoxine, en een versterkende hoeveelheid van een lysaat-gevoeligheid versterkend middel met lysaat-gevoeligheid versterkende eigenschappen, met het kenmerk, dat het lysaat versterkende middel wordt geselecteerd uit de groep bestaande uit
- (I) amfotere middelen met de formules A, B, C of D, waarin de symbolen de in conclusie 1 weergegeven betekenis bezitten,
- (II) anionactieve middelen met de formules E of F, waarbij de symbolen de weergegeven betekenis bezitten,
- (III) kationactieve middelen met de formule I, waarin de symbolen de weergegeven betekenis bezitten,
- (IV) nonionogene oppervlakteactieve middelen met de formule H, waarin de symbolen de weergegeven betekenis bezitten, alsmede een nonionogeen actief middel in de vorm van een condensatieprodukt van 10-30 mol ethyleenoxide met een monoëster van een zeswaardige alcohol met 6 koolstofatomen waarbij de estergroep 10-20 koolstofatomen telt.
11. Reagens volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat daarin bovendien aanwezig zijn de kationen Na^+ , Mn^{++} en Ca^{++} in een lysaatgevoeligheidverhogende hoeveelheid.
12. Reagens volgens conclusie 11, waarbij het lysaat aanwezig is in een hoeveelheid ter aantoning van ca. 0,007 tot ca. 0,05 ng/cm³

FDA reference endotoxin EC-2.

13. Reagens volgens conclusie 12, waarbij het versterkend middel wordt geselecteerd uit de groep van de amfotere middelen met de formule A.

5 14. Reagens volgens conclusie 13, met het kenmerk, dat n is 0, R_4 is tetradecyl, R_2 en R_3 zijn elk methyl en R_1 trimethyleen voorstellen.

15. Reagens volgens conclusie 13, waarin n is 1, R_4 is trimethyleen, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 is $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2$.

10 16. Reagens volgens^y conclusie 12, met het kenmerk, dat het versterkende middel wordt geselecteerd uit de groep van de amfotere middelen met de formule D.

17. Reagens volgens conclusie 16, waarin n is 1, R_4 is propyleen, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 methyleen voorstellen.

15 18. Reagens volgens^y conclusie 16, waarin n is 1, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 methyleen voorstellen.

19. Reagens volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat het is gelyofiliseerd.

20. Bij een werkwijze voor het bepalen van endotoxine onder endotoxine bepalende voorwaarden waarbij het endotoxine wordt omgezet met een *Limulus* amoebocyte lysaatreagens, de verbetering dat een *Limulus* amoebocyte lysaatreagens volgens conclusie 10 wordt gebruikt.

21. Reagens volgens conclusie 10, waarbij bovendien de kationen Na^+ , Sr^{++} , Ca^{++} en Mg^{++} in lysaat gevoeligheidverhogende hoeveelheden aanwezig zijn.

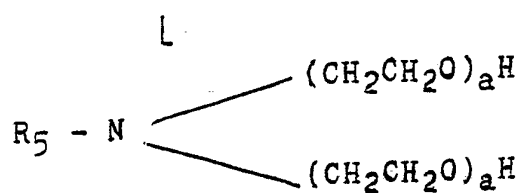
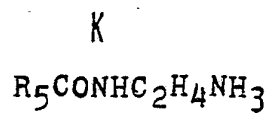
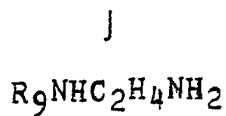
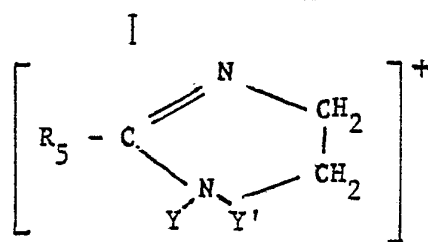
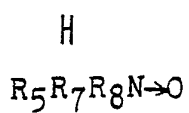
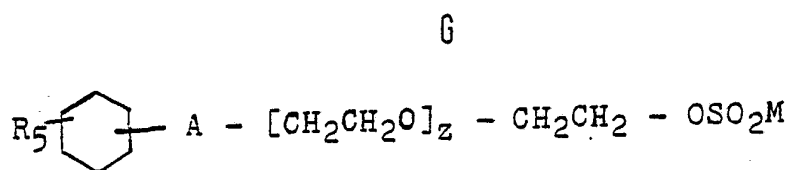
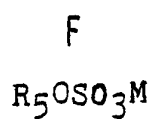
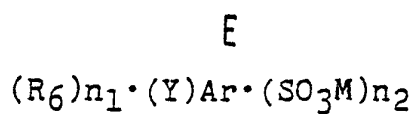
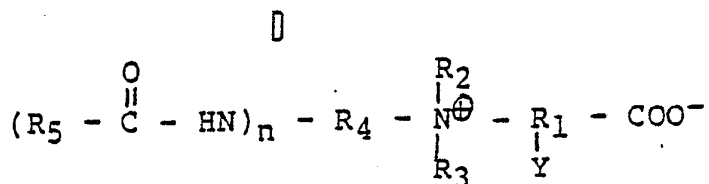
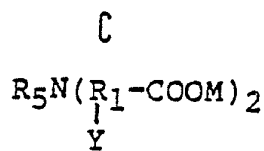
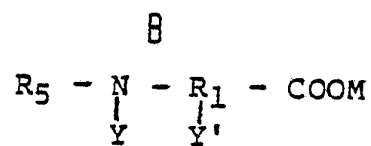
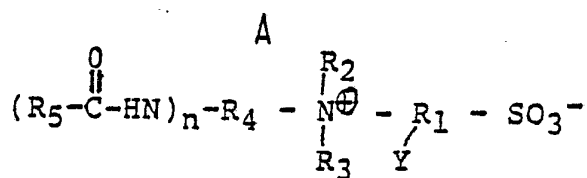
22. Reagens volgens conclusie 21, waarbij het lysaat aanwezig is in een hoeveelheid ter aantoning van ca. 0,007-0,05 ng/cm³ FDA reference endotoxin EC-2.

23. Reagens volgens conclusie 22, waarbij het versterkende middel wordt geselecteerd uit de groep van de amfotere middelen met de formule A.

24. Reagens volgens conclusie 23, waarbij n is 0, R_4 is tetradecyl, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 trimethyleen voorstellen.

25. Reagens volgens conclusie 23, waarin n is 1, R_4 is trimethyleen, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 $\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2$ voorstellen.

26. Reagens volgens conclusie 21, met het kenmerk, dat het versterkende middel wordt geselecteerd uit de groep van de amfotere middelen met de formule D.
27. Reagens volgens conclusie 26, met het kenmerk, dat n is 1,
- 5 R_4 is propyleen, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 methyleen voorstellen.
28. Reagens volgens conclusie 26, waarin n is 0, R_2 en R_3 elk methyl en R_1 methyleen voorstellen.



8103113