(11) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** 142145

DANMARK

(51) Int. Cl.³ C 07 G 7/00 // G 01 N 33/94

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Ansøgning nr. 2282/71 (22) Indleveret den 12. maj 1971

(24) Løbedag 12. maj 1971

(44) Ansøgningen fremlagt og fremlæggelsesskriftet offentliggjort den 8. sep. 1980

(30) Prioritet begæret fra den
13. maj 1970, 36999, US

(71) F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT, Grenzacherstrasse 124-184, Postfach, CH-4002 Basel, CH.

(72) Opfinder: Sidney Spector, 12 Troy Drive, Livingston, N.J., US.

(74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Plougmann & Vingtoft Patentbureau.

(54) Modificeret opiumsalkaloidantigen til anvendelse ved fremstilling af et antistof til brug ved påvisning af tilstedeværelsen af et opiumsalkaloid i en biologisk væske.

Den foreliggende opfindelse angår et hidtil ukendt modificeret opiumsalkaloidantigen til anvendelse ved fremstilling af et antistof til brug ved påvisning af tilstedeværelsen af et opiumsalkaloid i en biologisk væske.

Den kraftige udbredelse af befolkningens anvendelse af narkotiske midler, herunder opiumsalkaloiderne, har medført et betydeligt behov for at forbedre de analytiske metoder til bestemmelse af sådanne midler i biologiske væsker. I mange tilfælde har medicinske behandlingscentrer behov for at bestemme identiteten af et narkotisk mid-

del, som er indtaget af en patient, der, da han eller hun er i comatøs tilstand, ikke er i stand til at meddele den behandlende læge de hertil nødvendige oplysninger. De kendte metoder til identifikation af opiumsalkaloider omfatter ekstraktion og tyndtlagschromatografi. Disse metoder har den ulempe, at de er forholdsvis tidsrøvende og arbejdskrævende og uden større følsomhed. En mere hurtig og højfølsom prøve for tilstedeværelsen af opiumsalkaloider i biologiske væsker ville således betegne et overordentligt vigtigt fremskridt på området.

Man har i nogen tid vidst, at forskellige små molekyler (haptener), som i sig selv er fuldstændig frie for antigenicitet, kan modificere et proteins antigene egenskaber, når det lille molekyle kombineres med proteinet gennem stabile covalente bindinger. Det beskrives således i USA patentskrift nr. 2.372.066, at der kan fremstilles antigener ved at kombinere histaminer eller histaminlignende forbindelser ved sammenknytning af imidazolringen med et ønsket protein gennem et radikal, som indeholder en gruppe, der kan koble med proteinet. Disse antigener anvendes til injektion i værtsorganismer, af hvilke der udvikles antistoffer, som er specifikke over for haptendelen, f.eks. histaminet eller det histaminlignende stof. Endvidere har Landsteiner i en artikel med titlen "Specificity of Serological Reactions", Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts (1945) beskrevet udnyttelsen af p-aminobenzen-arsensyre som hapten, som, når den kobles til et protein, er i stand til at fremkalde specifikke antistoffer i en animalsk værtsorganisme.

De hidtil ukendte modificerede antigener ifølge den foreliggende opfindelse afhjælper de ovenfor anførte ulemper og er ejendommelige ved, at de består af et carboxy-C_{1-6}-alkylderivat af den phenoliske hydroxygruppe i et opiumsalkaloid koblet ved peptidbindinger til aminogrupper i et protein, hvilket protein har den egenskab, at det i sig selv fremkalder immunogenisk reaktion i et værtsdyr ved injektion i værtsdyret.

Peptidbindingen involverer aminogruppen i proteinmolekylet og carboxygruppen i carboxy-C_{1-6}-alkyl-sammenknytningsgruppen. Denne sammenknytningsgruppe er bundet til opiumsalkaloidet som derivat af den phenoliske hydroxylgruppe.

Det anvendte proteins identitet er ikke kritisk. Eksempler på foretrukne proteiner, der kan udnyttes til opfindelsens formål, er serumproteinerne, fortrinsvis serumproteiner fra pattedyr, f.eks. humant gammaglobulin, humant serumalbumin, serumalbumin fra kaniner, gammaglobulin fra kvæg og, hvad der foretrækkes ifølge opfindelsen, da det i praksis har givet udmærkede resultater, okseserumalbumin. Andre velegnede proteinprodukter vil være indlysende for en fagmand. Det foretrækkes sædvanligvis at anvende proteiner, som er fremmede for den animalske værtsorganisme, i hvilken det resulterende antigen skal anvendes.

Det særlig foretrukne opiumsalkaloid til den foreliggende opfindelses formål er morphin. Andre egnede opiumsalkaloider er f.eks. heroin og codein samt derivater deraf, i hvilke den phenoliske hydroxylgruppe er intakt. Det har vist sig, at de antistoffer, der fremkaldes ved anvendelse af et morphinhapten-proteinantigen, ikke blot er specifikke over for morphin, men også over for nært beslægtede derivater såsom codein og i mindre grad nalorphin.

Det modificerede opiumsalkaloidantigen kan fremstilles ved, at man omsætter et carboxy-C_{1-6}-alkylderivat af den phenoliske hydroxylgruppe i et opiumsalkaloid med et immunogenisk bæremateriale, hvilket har den egenskab, at det i sig selv fremkalder immunogenisk reaktion i et værtsdyr ved injektion i værtsdyret.

Det foretrukne modificerede opiumsalkaloidantigen ifølge opfindelsen er et sådant, i hvilket carboxy-C_{1-6}-alkylderivatet er 3-O-carboxymethylmorphin, hvilket i praksis har vist sig at give udmærkede resultater.

Det foretrækkes, at fra ca. 30 til ca. 10.000, fortrinsvis fra ca. 100 til ca. 1000, mol af carboxy-C_{1-6}-alkylderivatet af et opiumsalkaloid omsættes med 1 mol af proteinet.

Det første trin ved fremstillingen af antigenet går ud på, at opiumsalkaloidet omdannes til carboxy-C_{1-6}-alkylderivatet af alkaloidets phenoliske hydroxylgruppe. Dette sker mest hensigtsmæssigt ved omsætning af den frie alkaloidbase med et alkalimetalsalt af en halogensubstitueret alkancarboxylsyre med 1 - 6, fortrinsvis 1 - 4, carbonatomer. Egnede halogensubstituerede alkancarboxylsyrer til anvendelse til opfindelsens formål er β-halogeneddikesyre, γ-halogenpropionsyre og δ-halogensmørsyre.

De egnede alkalimetalsalte af de nævnte halogenalkancarboxylsyrer er fortrinsvis natrium-, kalium- og lithiumsalte; natriumsaltene foretrækkes. Halogenderivaterne af de nævnte alkancarboxylsyrer er chlor-, brom-, iod- og fluorderivaterne. Ved en særlig foretrukken udførelsesform, jfr. ovenfor omdannes fri morphinbase til sit 3-O-carboxymethylderivat ved omsætning med natrium-β-chloracetat. Den nævnte almene omsætning lettes ved, at den udføres i nærværelse af et egnet inert organisk opløsningsmiddel, f.eks. en lavere alkanol såsom ethanol. Det foretrækkes, at opløsningssystemet er vandfrit, og der anvendes således fortrinsvis en absolut lavere alkanol. Udtrykket "lavere alkanol" skal her betegne lige og forgrenede alkanoler med 1 - 7 carbonatomer.

Den omsætning, ved hvilken carboxy-C_{1-6}-alkylgruppen indføres i opiumsalkaloidmolekylet, kan hensigtsmæssigt udføres ved en temperatur i området fra omtrentlig stuetemperatur til ca. 50°C. men der kan også, om ønsket, anvendes højere eller lavere temperaturer. Det foretrækkes at udføre omsætningen ved stuetemperatur.

Koblingen af carboxy-C_{1-6}-alkylderivatet af opiumsalkaloidet med et protein til dannelse af det modificerede antigen ifølge den foreliggende opfindelse kan let udføres under anvendelse af nu i proteinkemien velkendte metoder til etablering af peptidbindinger. Ved en af disse metoder kan man opløse protein og et vandopløseligt koblingsmiddel i vand og derefter tilsætte et stort molekylært overskud af det ønskede carboxy-C_{1-6}-alkyl-opiumsalkaloidderivat. Denne omsætning kan udføres ved en temperatur i området fra ca. 0°C til ca. 50°C, men der kan også anvendes højere eller lavere temperaturer, afhængigt af reaktanternes art og af proteinets denatureringstemperatur. En særlig foretrukken temperatur er omkring stuetemperatur.

Det er hensigtsmæssigt at anvende et let surt reaktionsmedium, hensigtsmæssigt et medium med en pH-værdi i området fra ca. 3 til ca. 6,5, fortrinsvis i området fra ca. 4 til ca. 6,5, helst ca. 5,5, og en temperatur fra ca. 0 til ca. 50°C. Egnede vandopløselige koblingsmidler er f.eks. vandopløselige carbodiimider såsom 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid.

Når den ovennævnte koblingsreaktion er tilendebragt, kan overskud af haptenmolekyler og koblingsmidler fjernes ved dialyse. Dialysens for= løb kan kontrolleres ved, at dialysatet undersøges til konstatering af tilstedeværelsen af hapten eller koblingsmidler, eller alternativt ved, at den udføres i et i forvejen bestemt tidsrum, f.eks. 7 dage. Dialysen udføres i destilleret vand, som fortrinsvis skiftes 4 - 5 gange pr. dag. Det rensede antigen udvindes som remanens i dialyse= posen.

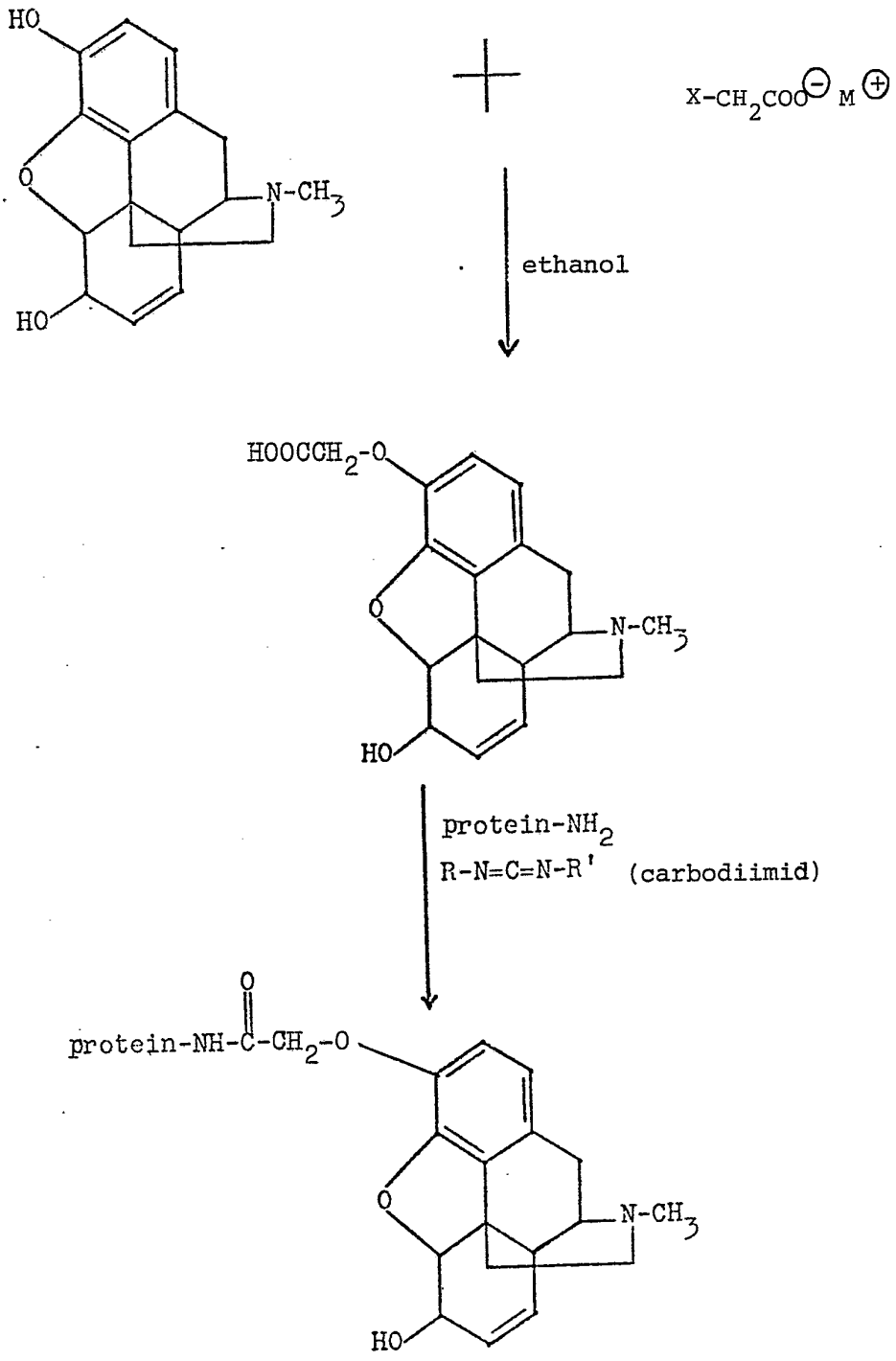
Andre velegnede opløsningsmedier end vand til anvendelse ved den ovennævnte reaktion er f.eks. 0,15M saltopløsning (NaCl), en 0,15M saltopløsning pufret med 0,01M phosphatpuffer (pH-værdi 7,4) eller en 0,01M phosphatpufferopløsning. Reaktionsblandingen indstilles i det ønskede pH-værdiområde ved tilsætning af fortyndet vandig syre, f.eks. 1N HCl. Opløsningsmidler, som denaturerer proteiner, f.eks. organiske opløsningsmidler såsom alkoholer og ethere eller stærke uorganiske syrer eller baser såsom mineralsyre eller alkalimetal= hydroxider, bør almindeligvis ikke anvendes.

Omfanget af det molære overskud af haptenen i forhold til proteinet ved den ovennævnte reaktion vil naturligvis afhænge af identiteten af det anvendte opiumsalkaloidderivat og af det protein, der vælges til omsætningen. Almindeligvis anvendes et molært overskud i området fra ca. 30 til ca. 10.000, fortrinsvis i området fra ca. 100 til ca. 1000, af haptenen i forhold til proteinet.

Det viser sig sædvanligvis, at fra ca. 3 til 7 opiumsalkaloidderi= vatgrupper adderes til et proteinmolekyle, naturligvis afhængigt af omfanget af molært overskud af den anvendte hapten. Således vil f.eks. 3 - 4 carboxymethylmorphingrupper blive adderet til et molekyle kvæg= serumalbumin (forudsat en molekylvægt på 70.000 for proteinet), når der anvendes et 100 ganges molært overskud af haptenen.

Det formodes, at den reaktionssekvens, som udnyttes ved fremstil= lingen af det omhandlede antigen, er en sådan, som fremgår af nedenstående reaktionsskema. I skemaet anvendes 3-O-carboxymethyl= morphin som eksempel på haptengruppen.

Reaktionsskema



modificeret antigen

I reaktionsskemaet betegner X halogen, og M betegner et alkali=metal.

Det modificerede opiumsalkaloidantigen ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes til inducering af dannelsen af opiumsalka=loid-specifikke antistoffer i serummet hos værtsdyr, idet antige=net injiceres i denne vært gentagne gange over et tidsrum, serummet udvindes, antistoffet heri udfældes med en neutral saltopløsning, og antistoffet renses, om ønsket, ved dialyse og søjlechromatografi.

Velegnede værtsdyr til dette formål er pattedyr såsom kaniner, heste, geder, marsvin, rotter, køer og får. Det resulterende anti=stof vil have et flertal af aktive positioner, som selektivt vil danne complex med opiumsalkaloider, det ovenfor beskrevne opiums=alkaloidantigen eller nært beslægtede derivater, og dette anti=stof udgør derfor et værdifuldt diagnostisk reagens til bestemmelse af opiumsalkaloider i biologiske væsker.

Opfindelsen belyses nærmere i følgende eksempler, af hvilke ek=sempel 1 angår fremstillingen af antigenet, medens eksempel 2 be=lyser antigenets anvendelse til fremstilling af det som reagens anvendelige antistof, og eksempel 3 belyser antistoffets anvendel=se som reagens ved en særdeles følsom prøve.

Eksempel 1.

Fremstilling af modificeret opiumsalkaloidantigen.

Morphin omdannes til 3-0-carboxymethylmorphin ved omsætning af den frie alkaloidbase med natrium-β-chloracetat i absolut ethanol i henhold til den metode, som er beskrevet i Houben: Fortschritte der Heilstoffchemie, 1, 882 (1901) og Beilstein, bind 27, 156. Efter omkrystallisation af varmt absolut ethanol har derivatpro=duktet et smeltepunkt på 292 - 293°C. 3-0-Carboxymethylmorphinsyren er Dragendorff-positiv og Pauly-negativ og har en R_f-værdi på 0,6 ved tyndtlagschromatografering på silicagel under anvendelse af iseddike:methanol (1:1) som opløsningsmiddelsystem. I samme opløs=ningsmiddelsystem har morphin en R_f-værdi på 1,0. Carboxymethylmor=

phinet kobles til okseserumalbumin (BSA) i vandig opløsning i nær= værelse af vandopløseligt carbodiimid efter følgende metode: I alt 8 mg carboxymethylmorphin opløses i 2 ml destilleret vand indehol= dende 10 mg BSA. Blandingens pH-værdi indstilles på 5,5 med 1N HCl, og der tilsættes 8 mg 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid. Blandingen henstår natten over ved stuetemperatur og dialyseres der= på i 7 dage mod destilleret vand med 4 - 5 udskiftninger pr. dag. Konjugater, der indeholder det modificerede opiumsalkaloidantigen, analyseret i henhold til den spektrofluorometriske metode ifølge Balatre et al., Annales Pharm. Franc. 19, 171 (1961), findes at indeholde 3 - 4 carboxymethylmorphingrupper pr. molekyle BSA (for= udsat en molekylvægt på 70.000 for proteinet).

Eksempel 2.

Fremstilling af antistof.

Kaniner af New Zealand-albinostammen immuniseres med 1 mg carboxy= methylmorphin-BSA, der er opløst i en phosphatpuffer-saltop= løsning med pH-værdi 7,4 og emulgeret med et lige så stort rumfang Freund's komplette adjuvans, ved injektion i trædepuden (0,4 ml/træ= depude). Forstærkningsinjektioner på 100 µg antigen i adjuvans gives hver 6.- 8. uge i trædepuden og siderne.

Antiserum høstes 5 - 7 dage efter forstærkningsinjektionerne. Blod, som opsamles ved hjertepunktur, henstår ved 37°C i 1 time og hol= des derefter natten over ved 4°C. Efter centrifugering ved 5000 omdrejninger pr. minut i 30 minutter ved 4°C skilles serummet fra klumperne.

Eksempel 3.

Radioimmunoprøve på tilstedeværelse af opiumsalkaloid.

Radioimmunoprøven udføres ved, at forskellige fortyndinger af anti= sera fremstillet som beskrevet i eksempel 2 henstår i nærværelse af dihydromorphin-H^3 (New England nuclear, 388 mc/mM), 100 picomol (4000 cpm) ved 4°C natten over. Efter henstanden sættes der en neu=

tral mættet ammoniumsulfatopløsning (samme rumfang som henstands= mediet) til alle glas. Bundfaldet, som sedimenteres ved centrifuge= ring ved 5000 omdrejninger pr. minut i 15 minutter ved 4°C, vaskes to gange i 50%'s ammoniumsulfatopløsning. Det vaskede bundfald, som indeholder antistof-bundet morphin, opløses i 0,5 ml kommercielt detergent som opløseliggørende middel og overføres kvantitativt til og tælles i et Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer.

Et glas, som indeholder dihydromorphin-H^3 og et antiserum (frem= stillet som beskrevet i eksempel 2), men intet ikke-radioaktivt morphin, tjener som mål for den maksimale antistof-bundne radioaktivi= tet. Ved tilsætning af stigende mængder ikke-radioaktivt morphin til en bestemt mængde dihydromorphin-H^3 og antiserum opnås konkur= rerende inhibition af det mærkede dihydromorphin med hensyn til dannelsen af antistof-hapten-complexet. De konstaterede data frem= går af nedenstående tabel I:

Tabel I

Nanogram ikke-radioaktivt morphin tilsat	Procentvis inhibition af bindingen af dihydromorphin-H^3
0,5	20
2,0	38
3,0	50
4,0	65
5,0	80

De ovenstående data viser klart metodens følsomhed. Ved optegning i grafisk kurveform viser de i ovenstående tabel indeholdte data en lineær relation mellem mængden af tilsat ikke-radioaktivt morphin og den fundne procentmæssige inhibition. Ved tilsætning af 0,5 nano= gram ikke-radioaktivt morphin pr. glas (en koncentration på 1 nanogram pr. ml før tilsætning af ammoniumsulfat) fortrænges 20% af det radio= aktive dihydromorphin fra antistoffet. Antiserummets specificitet for morphin påvises ved inkubation af den radioaktive hapten med normal kaninserum. Den radioaktivitet, som bliver tilbage i et bundfald fra normalt kaninserum efter vaskning, ligger svagt over baggrunds= radioaktiviteten og substraheres fra de værdier, som konstateres på alle de andre glas.

Der udføres også sammenligningsforsøg med andre alkaloider. Den inhiberende virkning af codein, som er morphin-3-methylether, sammenlignes med morphins inhiberende virkning. Codein viser sig at være endog mere effektivt end morphin (på molær basis) med hensyn til at give 50% inhibition af udfældningen af radioaktivt materiale. Dette er ikke overraskende, eftersom codein har større strukturel lighed med den immuniserende carboxymethylmorphingruppe end morphin selv. Det viser sig endvidere, at 500 nanogram nalorphin nedsætter udfældningen af radioaktivitet med ca. 35%, medens den samme mængde methadon giver ringe eller ingen inhibition.

Patentkrav.

1. Modificeret opiumsalkaloidantigen til anvendelse ved fremstilling af et antistof til brug ved påvisning af et opiumsalkaloid i en biologisk væske,
k e n d e t e g n e t ved, at det består af et carboxy-C_{1-6}-alkylderivat af den phenoliske hydroxygruppe i et opiumsalkaloid koblet ved peptidbindinger til aminogrupper i et protein, hvilket protein har den egenskab, at det i sig selv fremkalder immunogenisk reaktion i et værtsdyr ved injektion i værtsdyret.

2. Modificeret opiumsalkaloidantigen ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at proteinet er okseserumalbumin.

3. Modificeret opiumsalkaloidantigen ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at carboxy-C_{1-6}-alkylderivatet af et opiumsalkaloid er 3-O-carboxymethylmorphin.

Fremdragne publikationer: