



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149968 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 0291/76

(51) Int.Cl.⁴: G 01 N 33/53

(22) Indleveringsdag: 26 jan 1976

G 01 N 30/90

(41) Alm. tilgængelig: 28 jul 1976

(44) Fremlagt: 03 nov 1986

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: 27 jan 1975 SE 75008417

(71) Ansøger: AKTIEBOLAGET *KABI; Stockholm, SE.

(72) Opfinder: Anders Olof *Grubb; SE, Ulla Cristina *Glad; SE.

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) Fremgangsmåde til immunkemisk mængdebestemmelse af et antigen

DK 149968 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til immunkemisk mængdebestemmelse af et antigen, fortrinsvis ved diagnosticering i den kliniske kemi.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i patentkravets kendetegnende del anførte.

Fra tysk fremlæggelsesskrift nr. 2164768 kendes en fremgangsmåde til bestemmelse af en komponent i en reaktion mellem et specifikt bindeprotein og et stof med tilsvarende bindingsevne, fx en antistof-antigen-reaktion, under udnyttelse af bindingsaffiniteten, hvorved man ved bestemmelsen gør brug af en kendt mængde af et koblingsprodukt af stoffet med bindingsevne og et enzym, og af uopløseliggjorte antistoffer mod det specifikke bindeprotein, hvorpå man efter reaktionens afslutning bestemmer enzymaktiviteten i reaktionsblandingen flydende eller faste fase som mål for de til bestemmelse værende komponenter.

Ved denne kendte fremgangsmåde ender det til mængdebestemmelse værende antigen således med at være bundet til antistoffet/bæreren i en mængde der er repræsentativ for koncentrationen deraf. Men det der faktisk bestemmes er mængden af antigenet på bæreren.

Ved den foreliggende opfindelse foranlediger man det til mængdebestemmelse værende antigen til at foretage kapillærvandring langs antistoffet/bæreren, og den gennemvandrede strækning tages som mål for koncentrationen af antigenet. Det kan siges at den med antistoffet "imprægnerede" bærer bruges som en slags kromatogram for testantigenet, hvorimod den ved den kendte fremgangsmåde bruges som inert bærer for testantigenet.

Bestemmelse af koncentrationen ved den tilbagelagte vandringsvejlængde er langt enklere end bestemmelse af mængden af antigenet bundet til den uopløselige bærer. Vandringsvejlængden kan bedømmes visuelt, og det er ganske enkelt at foretage visuel sammenligning af de vejlængder henholdsvis testantigenet med ukendt koncentration og antigenprøver med kendt koncentration har tilbagelagt. Dermed kan bestemmelsen ske hurtigere end ved den kendte fremgangsmåde.

Ved udøvelse af mængdebestemmelsesmetoden ifølge opfindelsen dyppes det porøse eller kapillærholdige bæremateriale i en prøve som indeholder et antigen der skal mængdebestemmes. Derefter sker der kapillærvandring. Så indikeres de antigenholdige områder af det diagnostiske middel ved tilsætning til det med den antigenholdige prøve befugtede middel af antistoffet bundet til en passende farveindikator såsom en fluorescerende forbindelse, et enzym som katalyserer en farvereaktion eller en let iagttagelig partikel.

Antistoffer egnet til anvendelse ved fremgangsmåden vindes på kendt måde ved immunisering af et dyr af en anden art end den som bærer det antigen, det ønskes at bestemme. Fx kan man let vinde antistoffer mod menneskets proteiner (albumin, gammaglobulin, fibrinogen, transferrin) fra kaniner, geder, får, heste eller marsvin. Sådanne antistoffer er til stede i blodet hos immuniserede individer; nærmere betegnet indeholder gammaglobulinfraktionen (immunglobulinfraktionen) antistofferne.

Hidtil anvendte kvantitative immunkemiske metoder er baseret på immundiffusion som fx ved Mancinis eller Ouchterlony's metoder, der er opkaldt efter deres respektive opfindere, eller ved immunelektroforese som ved Laurell's elektroimmunprøve. Disse metoder såvel som varianter deraf frembringer den nødvendige indbyrdes virkning mellem antigen og antistof ved en diffusionsproces og/eller en elektroforetisk proces. I modsætning hertil er fremgangsmåden ifølge opfindelsen baseret på udnyttelse af kapillærkræfterne i et porøst bæremateriale hvortil der er bundet antistoffer.

Porøse eller kapillærholdige materialer der egner sig til brug i forbindelse med den foreliggende opfindelse er fx forskellige slags cellulosefibrholdige materialer såsom filterpapir, kromatografipapir, ionbytterpapir, celluloseacetatfilm, celluloseacetatskiver, celluloseskiver til tyndlagskromatografi såvel som film af sådanne materialer som stivelse eller "Sephadex"[®] et 3-dimensionalt netværk af destrukstrankæder tværbundet med epiklorhydrin), film af plastmaterialer såsom polyvinylklorid, keramiske materialer og kombinationer såsom polyvinylklorid-kiselsyreanhydrid.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen skal belyses nærmere ved nogle litererede eksempler, idet der forud for disse er anført nogle nummerede eksempler på fremstilling af diagnostiske midler til brug ved fremgangsmåden.

Fremstilling af det diagnostiske middel

Eksempel 1 Binding af antistoffer på kapillærholdigt materiale med CNBr.

10 g filtrerpapir som repræsentant for celluloseholdigt materiale neddyppes i destilleret vand i 5 minutter. Derefter tilsættes der en opløsning af 8 g CNBr i 300 ml destilleret vand og pH reguleres til 10,5 med 1 M NaOH og holdes på denne værdi ved passende tilsætning af et passende pH-reguleringsmiddel. Reaktionen fortsættes i en periode på 20 minutter og derefter dekanteres den ovenstående væske af. Det CNBr-behandlede cellulosemateriale vaskes med 2 liter 0,005 M NaHCO_3 . Efter fjernelse af vaskeopløsningen inkuberes det CNBr-behandlede cellulosemateriale natten over ved $+4^\circ\text{C}$ i en opløsning af 500 mg kanin-gammaglobulin mod human gammaglobulin (IgG Fc fragmentet) i 10 ml 0,1 M NaHCO_3 og inkuberes derefter påny i 3 timer med 100 ml 0,005 M ætanolamin i vandig opløsning, efterfulgt af yderligere en vask med 500 ml 0,5 M NaHCO_3 og derpå 200 ml 0,1 M acetatpuffer med pH 4,0 og 500 ml 0,075 M natriumbarbituratpuffer med 0,3% albumin tilsat ved $+4^\circ\text{C}$.

Eksempel 2 Binding af antistoffer på kapillærholdigt materiale med glutaraldehyd

0,6 g celluloseacetatfilm inkuberes med en opløsning af 100 mg kanin-gammaglobulin mod humant gammaglobulin (IgG Fc fragmentet) i 10 ml 0,1 M fosfatpuffer med pH 6,8 i 30 minutter. Efter at opløsningen er blevet dekanteret inkuberes filmen i 10 ml 1% vandig opløsning af glutaraldehyd i 30 minutter, efterfulgt af inkubering i 10 ml 1,0 M vandigt metylamin i 15 minutter. Derefter vaskes filmen med 100 ml 0,075 M natriumbarbituratpuffer og holdes i denne puffer ved $+4^\circ\text{C}$ efter at der er blevet sat 0,3% albumin dertil.

Eksempel 3 Binding af antistoffer til kapillærholdigt bæremateriale ved adsorption

10 g polyvinylklorid-kiselsyreanhydrid ("Microporous Plastic Sheet" kiselsyreanhydridindhold ca. 50%; fra Amerace Esna Corporation, New York, N.Y., USA) inkuberes natten over ved $+4^{\circ}\text{C}$ med en opløsning af 500 mg kanin-gammaglobulin mod humant gammaglobulin (IgG Fc fragmentet) i 100 ml 0,1 M fosfatpuffer ved pH 6,8. Efter fuldførelse af denne inkubering vaskes materialet med 1 liter fosfatpuffret fysiologisk NaCl-opløsning ved pH 7,0. Det resulterende polyvinylklorid-kiselsyreanhydrid-ark med adsorberet gammaglobulin tørres mellem filterpapir.

Eksempel 4 Fremstilling af fluorescerende antistof-konjugater

a) 720 mg kanin-gammaglobulin mod humant gammaglobulin (IgG Fc fragmentet) 0,57 g NaCl, 0,259 g NaHCO_3 og 0,049 g Na_2CO_3 , 10 H_2O opløses i 72 ml destilleret vand. Den resulterende reagensopløsning afkøles i et isbad og der tilsættes 36 mg fluoresceinisiocyanat under omrøring. Opløsningen henstår derefter i kulden under omrøring i 18 timer. Derefter dialyseres blandingen mod fosfatpuffret fysiologisk NaCl ved en pH-værdi på 7,0 indtil dialysevæsken holder op med at fluorescere. Det resulterende antistofkonjugat fryses.

b) 720 mg kanin-gammaglobulin mod humant gammaglobulin (IgG Fc fragmentet), 0,57 g NaCl, 0,259 g NaHCO_3 og 0,049 g Na_2CO_3 , 10 H_2O opløses i 72 ml destilleret vand. Den resulterende reagensopløsning afkøles i et isbad og under omrøring tilsættes der 9 mg rhodamin opløst i 2 ml acetone. Opløsningen henstår i kulden under omrøring i 18 timer. Derefter dialyseres blandingen mod fosfatpuffret fysiologisk NaCl ved pH 7,0 indtil dialysevæsken holder op med at fluorescere. Det resulterende antistofkonjugat fryses.

c) 720 mg kanin-gammaglobulin mod humant gammaglobulin (IgG Fc fragmentet), 0,57 g NaCl, 0,259 g NaHCO_3 og 0,049 g Na_2CO_3 , 10 H_2O opløses i 72 ml destilleret vand. Den resulterende reagensopløsning afkøles i et isbad og under omrøring tilsættes der 20 mg dansylklorid opløst i 7 ml acetone. Opløsningen henstår i kulden under omrøring i 18 timer. Derefter dialyseres blandingen mod fosfatpuffret fysiologisk NaCl-opløsning ved en pH-værdi på 7,0 indtil dialysevæsken holder op med at fluorescere. Det resulterende antistofkonjugat fryses.

Eksempel 5 Fremstilling af LDH isoenzym H₄ antistofkonjugat

En suspension af 4,5 mg LDH (mælkesyredehydrogenase) isoenzym H₄ i ammoniumsulfat dialyseres mod 0,1 M fosfatpuffer ved pH 6,8. Under omrøring tilsættes der 2,25 mg kanin-gammaglobulin mod humant gammaglobulin (IgG Fc fragmentet) samt fosfatpuffer så der opnås et samlet rumfang på 1,35 ml. Når alt kanin-gammaglobulinet er opløst, tilsættes der 45 µl 1% glutaraldehydopløsning dråbevis og reaktionen henstår ved stuetemperatur i 2 timer. Blandingen dialyseres derefter mod natriumbarbituratpuffer og konjugatet opbevares ved +4°C. Før brugen fortyndes det med 10 ml barbituratpuffer hvortil der er sat 2% albumin.

Eksempel 6 Afprøvning af antistofbindingen til bæreren

To strimler af et hvilket som helst af de nævnte porøse materialer behandlet med antistofferne ifølge et hvilket som helst af eksemplerne 1 til 3 samt to ubehandlede strimler af samme porøse materialer bruges til prøven. En strimmel af hver slags (dvs behandlet og ubehandlet) inkuberes i en opløsning af 1 mg human gammaglobulin (IgG) per ml natriumbarbituratpuffer. Derefter vaskes alle strimlerne med 20 ml natriumbarbituratpuffer indeholdende 0,15 M NaCl, ialt ti gange, hvorefter de inkuberes i en opløsning af fluoresceinisotiocyanat-antistofkonjugat i 10 minutter. Efter gentagne vaskninger som i det foregående trin tørres strimlerne og undersøges under ultraviolet lys ved en bølgelængde på 340 nm for at fastslå at der kun foreligger fluorescens hos de strimler som indeholder de bundne antistoffer og som er blevet inkuberet i IgG-opløsningen. Ved afprøvning af strimler fremstillet i henhold til eksempel 3 bruges der som kontrol strimler behandlet med oksealbumin.

Immunkemisk mængdebestemmelseEksempel A

Diagnostiske midler fremstillet i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse anvendes til immunokemisk mængdebestemmelse til diagnostiske formål på følgende måde:

Det til mængdebestemmelse værende materiale anbringes i en kendt mængde, fortrinsvis mellem 1 μ l og 3 μ l, på den valgte form af et porøst eller kapillærholdigt bæremateriale samtidig med at en lige så stor rumfangsmængde af en standardopløsning med et kendt indhold af det antigen, der skal prøves for, og i forskellige fortyndinger anbringes ved siden af testopløsningen.

0,075 M natriumbarbituratpuffer med tilsat 0,3% albumin kan fx bruges som mobil fase til at lette kapillærvandringen.

Kapillærvandringen kan gennemføres både i åbne og lukkede testrecipienter; desuden kan den mobile fase bringes til at bevæge sig opad eller nedad. Med fordel bruger man en kombination af en lukket recipient og en opadstigende mobil fase. På et ønsket tidspunkt, sædvanligvis ca. 10-45 minutter efter igangsætningen af kapillærvandringen, overføres det fugtige bæremateriale til en antistofopløsning indeholdende enten fluoresceinisiotiocyanatbundne eller mælkesyredehydrogenase (LDH)-bundne antistoffer. Den foretrukne inkubationstid for begge disse indikatoropløsninger er 10 minutter. Efter inkuberingen vaskes bærematerialet under rindende vand ved +37°C i 5 minutter, efterfulgt af inkubering i fortrinsvis 2 x 5 minutter i 20 ml natriumbarbituratpuffer indeholdende 0,2% albumin og 0,15 M NaCl.

I det omfang der bruges fluorescerende antistoffer til identifikationen, måles antigenets vandringslængde i ultraviolet lys ved 340 nm. Hvis der bruges en LDH-antistofopløsning behandles bærematerialet i et farvebad sammensat på følgende måde:

30 mg nitroblåt-tetrazolium (2,2'-di-p-nitrofenyl-5,5'-difenyl-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difenylen)-ditetrazoliumklorid) og 40 mg NAD opløses i 56 ml 0,05 M TRIS-puffer ved pH 7,4. Til blandingen sættes der 1,60 ml 3,6 M litiumlaktat, 5 ml 0,06 M kalciumcyanid og nogle få korn metylfenazoniummetasulfat opløst i 2 ml destilleret vand. Det kapillærholdige materiale inkuberes i farvebadet ved

+37°C indtil der kan iagttages en distinkt farvning. Farveudviklingen skyldes den omstændighed at LDH katalyserer reaktionen af laktat + NAD $\rightleftharpoons$ Pyruvat + NADH₂ og at NADH₂ kvantitativt reducerer nitroblåt-tetrazolium til en uopløselig lillafarvet forbindelse af formazantypen (Organic Chemistry, Fieser & Fieser, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1956).

De indikerede antigendækkede områder af det diagnostiske middel vil så øges i størrelse med stigende indhold af antigen i de til testning værende prøver. De bundne antistofmolekyler forsinker vandringer af antigenmolekylerne ved udbytningsreaktioner under kapillærvandringen. Desto højere koncentrationen er af antigener, desto mindre vil den forsinkende effekt være fordi den gennemsnitlige tidsperiode i hvilken et antigenmolekyle bliver bundet til et antistof vil aftage med stigende koncentration af antigener.

Eksempel B

Strimler af det antistofholdige, porøse (dvs forsynet med kapillærer) bæremateriale fremstillet som beskrevet i eksempel 1-3 neddyppes til en forudbestemt dybde på fx 3 mm i et lille rumfang af en opløsning af det til testning værende antigenmateriale. Man lader den på denne måde igangsætte kapillærvandring fortsætte i fra ca. 3 til ca. 20 minutter, hvorefter den afbrydes ved at man fjerner strimmelen fra opløsningen. Antigenets vandringsvej måles derefter som beskrevet i eksempel A og resultatet bedømmes i overensstemmelse med eksempel A.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåde til immunkemisk mængdebestemmelse af et antigen, fortrinsvis ved diagnosticering i den kliniske kemi, k e n d e t e g n e t ved at kapillærkræfterne i et diagnosticeringsmiddel i form af et porøst bæremateriale, hvortil et antistof svarende til det til mængdebestemmelse foreliggende antigen er koblet eller adsorberet på i og for sig kendt måde, udnyttes til biospecifik adsorption af antigenet ved at en væskeformig prøve deraf tilføres det kapillærholdige diagnosticeringsmiddel, hvorpå man lader en kapillærvandring finde sted og derefter synliggør de antigenholdige områder af diagnosticeringsmidlet ved at bringe dem i kontakt med antistoffer koblet til en egnet indikator såsom en fluorescerende indikator, et enzym som katalyserer en farvereaktion eller en let iagttagelig partikel såsom et rødt blodlegeme, hvorpå man bestemmer antigenets vandringsvejlængde som udtryk for antigenkoncentrationen.

Fremdragne publikationer:

DK patent nr. 120309
DK ansøgning nr. 4184/68 (fremlæggelsesskrift nr. 131400)
DE fremlæggelsesskrifter nr. 1256445, 2164768
GB patenter nr. 1244462, 1298918.