

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 155967-B



(21) Patentansøgning nr.: 1962/82

(22) Indleveringsdag: 30 apr 1982

(41) Alm. tilgængelig: 03 nov 1982

(44) Fremlagt: 05 jun 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 02 maj 1981 NL 8102178

(51) Int.Cl.⁴

G 01 N 33/537

G 01 N 33/543

(71) Ansøger: *STICHTING CENTRAAL LABORATORIUM VAN DE BLOEDTRANSFUSIEDIENST VAN HET NEDERLANDSE RODE KRUIS; Plesmanlaan 125; 1066 CX Amsterdam, NL

(72) Opfinder: Robertus Carolus *Aalberse; NL

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Fremgangsmåde samt kit til bestemmelse af antistoffer mod opløselige antigener

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1962-82

Antistoffer mod opløselige antigener i en vandig prøve, navnlig i legemsvæsker, såsom blodserum eller blodplasma, bestemmes ved at kontakte prøven med et antigen, der er modificeret med en genkendelig gruppe, f.eks. et haptent, såsom en trinitrophenylgruppe, og hvilket modificeret antigen er opløseligt i forsøgsprøven, hvorved antistofferne, hvis de er tilstede, vil bindes til antigenerne. Dernæst separeres det modificerede antigen med bundet antistof fra opløsningen med et udfældningsmiddel eller et uopløseligt reagens, som vekselvirker med den genkendelige gruppe, og ethvert bundet antistof påvises og/eller kvantiteres derefter med velkendte metoder.

Et kit til anvendelse ved bestemmelsen af antigenspecifikke antistoffer omfatter et første reagens bestående af et med en genkendelig gruppe modificeret, i vandig opløsning opløseligt antigen, et andet reagens bestående af et udfældningsmiddel eller et uopløseligt reagens, som kan vekselvirke med den genkendelige gruppe, samt et tredje reagens bestående af et mærket anti-Ig.

Vekselvirkningen mellem antigen og antistof finder således sted i en homogen opløsning, hvilket ligner de fysiologiske betingelser, og der kræves kun ét udfældningsmiddel eller uopløseligt reagens, selvom der skal analyseres for antistoffer mod et stort antal antigener.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til bestemmelse af antistoffer mod opløselige antigener i en vandig prøve, navnlig i legemsvæsker, såsom blodserum eller blodplasma, ved hvilken fremgangsmåde prøven kontaktes med et antigen in vitro, hvorved antistoffer, hvis de er
5 til stede, bindes til antigenerne.

Opfindelsen angår ydermere et kit til bestemmelse og påvisning af antigenspecifikke antistoffer i en homogen, vandig opløsning, hvilket kit er egnet til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge
10 opfindelsen.

Ved medicin- og veterinærdiagnostik er der ofte behov for bestemmelse af antistoffer mod potentielle patogener i f.eks. blodserum, f.eks. mikroorganismer, toxiner, allergener eller andre antigener.
15 Disse antistoffer er proteiner med immunoglobulin (Ig) egenskaber, hvilket gør dem erkendelige med anti-Ig-reagenser. Disse anti-Ig-reagenser kan gøres påviselige ved konjugation med en radioaktiv isotop, et enzym, et fluorescerende farvestof, o.s.v.

Sådanne anti-Ig-reagenser differentierer ikke mellem antistoffer bundet til et dertil passende antigen (d.v.s. antigen-antistof-komplekser) på den ene side og andre immunoglobuliner (frit Ig) på den anden side. For antistofbestemmelser baseret på mærkede anti-Ig-reagenser er det derfor vigtigt at opnå en fysisk adskillelse mellem
20 antigen-antistof-komplekser og fri Ig. Når antigenet i sin native tilstand er væsentligt større end Ig, er antigen-antistofkomplekset også meget større end frit Ig. Et eksempel er analysen af ikke-aglutinerende antistoffer mod antigener på røde blodlegemer, hvor frie og bundne antistoffer kan separeres ved centrifugering.
25

30 I tilfælde med mindre antigener anvendes ofte kunstig forstørrelse af antigenet; vel etablerede procedurer er polymerisering af antigenet eller kobling af antigenet til et uopløseligt bæremateriale. En elegant løsning er adsorptionen af antigenet til indersiden af et reagensglas eller til overfladen af en plastkugle. I andre procedurer anvendes kemisk reaktive bærematerialer, f.eks. CNBr-aktiverede
35 papirskiver, til hvilke antigenet kobles via en kovalent binding.

I beskrivelsen til hollandsk patentskrift nr. 162.209 omtales en

fremgangsmåde af den ovenfor nævnte type, hvor der anvendes et antigen, som er blevet bundet til en uopløselig bærerpolymer på en sådan måde, at der ikke sker eluering ved vask. Når det således forstørrede antigen inkuberes med forsøgsprøven, kan der let foretages en fysisk separation mellem bundet og frit Ig. Frit Ig kan vaskes væk, hvorimod bundet antistof kan påvises og kvantiteres med et mærket anti-Ig-reagens.

En væsentlig ulempe ved den ovenfor nævnte fremgangsmåde er, at et stort antal antigenmolekyler koncentreret på en overflade kontaktes med den antistofholdige opløsning. Dette betyder, at reaktionsbetingelserne er væsentligt forskellige fra de fysiologiske betingelser, hvor antigenet er i opløsning, når det reagerer med antistoffet.

En anden vigtig ulempe ved den ovenfor nævnte fremgangsmåde er af praktisk art: Når forsøgsprøverne skal analyseres for antistofaktivitet mod et stort antal antigener, er det indlysende, at et stort antal fastfasekoblede antigener skal fremstilles, opbevares og uddeles.

Opfindelsens formål er at tilvejebringe en fremgangsmåde samt et kit, hvorved de ovenfor nævnte ulemper elimineres.

Dette formål opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der anvendes et antigen, der er modificeret med en genkendelig gruppe, at det modificerede antigen er opløseligt i forsøgsprøven, således at der sker en gensidig påvirkning mellem antigen og antistof i en homogen opløsning, at det modificerede antigen med bundet antistof, hvis dette er til stede, separeres fra opløsningen med et udfældningsmiddel eller et uopløseligt reagens, som vekselvirker med den genkendelige gruppe, og at ethvert bundet antistof derefter påvises og/eller kvantiteres ved velkendte metoder.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes der et modificeret, men opløseligt antigen i stedet for et fastfaseantigen, hvilket muliggør virkning eller vekselvirkning mellem antigen og antistof i en homogen opløsning. Antigenet modificeres på en sådan måde, at antigenet sammen med bundet antistof, hvis dette er til stede, kan

separeres fra opløsningen under betingelser, hvor ikke-bundet Ig forbliver i opløsningen.

5 Modifikationen medfører indføringen af en genkendelig gruppe (H) i antigenet. Separationen fra opløsningen udføres med et udfældningsmiddel eller et uopløseligt reagens, som vekselvirker med den genkendelige gruppe (H); dette reagens vil blive kaldet "anti-H".

10 Det er vigtigt for denne metode, at følgende fire betingelser for reaktionen mellem H og anti-H er opfyldt:

1. Vekselvirkningen mellem det modificerede antigen og anti-stoffet må ikke forstyrres.
- 15 2. Frit Ig reagerer ikke med anti-H.
3. Andre stoffer i forsøgsprøven interfererer ikke væsentligt.
- 20 4. Ig-determinanterne skal forblive tilgængelig for en efterfølgende vekselvirkning med anti-Ig.

25 En vigtig fordel ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er, at vekselvirkningen mellem antigen og antistof finder sted i en homogen opløsning. En anden fordel er, at selvom antistoffer mod et stort antal antigener skal undersøges, kræves kun et enkelt udfældningsmiddel eller fastfasereagens.

30 Der opnås gode resultater, når der anvendes en haptén som den genkendelige gruppe (H), og anti-haptén antistof er koblet til en fast fase som anti-H-reagens.

Som haptén anvendes fortrinsvis en trinitrophenylgruppe.

35 Der opnås ligledes gode resultater, når biotin anvendes som den genkendelige gruppe, og avidin er koblet til et fastfase bæremateriale som uopløseligt reagens.

Som fastfase anvendes almindeligvis plastkugler, f.eks. polystyrenkugler.

En mikrotiterplade tilvejebringer også en tilfredsstillende fast fase.

5 Ydermere kan kemisk aktiverede uopløselige polymerer anvendes med held, navnlig CNBraktiverede agarosekugler.

10 Vekselvirkningen mellem H og anti-H kan være baseret på en kovalent kemisk binding, f.eks. reaktionen mellem en aldehydgruppe og en hydrazidgruppe, eller på ikke-kovalent vekselvirkning, f.eks. vekselvirkningen mellem biotin og avidin eller mellem hapten og anti-haptent-antistof.

15 Anvendelsen af et uopløseligt anti-H-reagens i en immunoanalyse er omtalt i beskrivelserne til EPA 0 005 271 og FR-A nr. 2.415.301. De i disse patentskrifter omtalte metoder er kompetitive immunoanalyser, hvor et antistof er blevet modificeret med en haptent eller med biotin, og ved hvilken metode der anvendes et mærket antigen, som konkurrerer med ikke-mærket antigen i forsøgsprøven. I modsætning hertil angår fremgangsmåden ifølge opfindelsen en ikke-kompetitiv immunoanalyse, hvor et antigen er blevet modificeret, f.eks. med en haptent eller med biotin, og hvor der anvendes et mærket anti-Ig, som forenes med antistoffet i forsøgsprøven.

25 Opfindelsen angår ydermere et kit til analyse og bestemmelse af antistoffer rettet mod visse antigener i en homogen, vandig opløsning, hvilket kit er egnet til brug ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Dette kit indeholder et første reagens bestående af et med en genkendelig gruppe modificeret, i vandig opløsning opløseligt antigen, et andet reagens bestående af et udfældningsmiddel eller et 30 uopløseligt reagens, som kan vekselvirke med den genkendelige gruppe, samt et tredje reagens bestående af et mærket anti-Ig.

Ifølge en foretrukket udførelsesform er et eller flere af reagenserne frysetørret.

35

Opfindelsen vil nu blive illustreret ved følgende eksempler:

EKSEMPEL I

I dette eksempel beskrives et forsøg, hvor IgE antistoffer mod et antigen i græspollen påvises; dette antigen modificeres ved indfø-
ring af trinitrophenyl-(TNP-)grupper; anti-H-reagenset består af
anti-TNP-antistoffer koblet til en fast fase (plastkugler).

TNP-græspollen fremstilledes ved at omsætte 0,125 mg trinitroben-
zensulfonsyre med 5,0 mg dialyseret og frysetørret græspolleneks-
trakt i 0,2 M natriumboratpuffer, pH 9,0, i et slutvolumen på 0,85
ml.

Efter en reaktionstid på 2 timer ved 20-24°C og 16 timer ved 0-4°C
dialyseredes opløsningen mod phosphatpufferet saltvandsopløsning
(PBS).

Anti-TNP-antiserum tilvejebragtes ved at immunisere et får med
TNP-substitueret bovintserumalbumin ifølge standardprocedurer. Fra
denne antiserum isoleredes antistofferne ved adsorption på TNP-
Sephadex i overensstemmelse med kendte metoder; de adsorberede
antistoffer elueredes med en puffer bestående af 0,1 M glycin, 0,15
M NaCl og 10% (vægt/volumen) dioxan, pH 2,5. De eluerede antistoffer
overførtes til PBS ved gelfiltrering på Sephadex G25.

Den optiske densitet ved 280 nm af den opnåede opløsning var 0,400.
Disse anti-TNP-antistoffer adsorberedes på polystyrenkugler (diame-
ter 0,6 mm) ved 16 timers inkubation ved 20-24°C i en 1:20 for-
tynding af den antistofholdige opløsning i 0,1 M NaHCO₃-puffer, pH
9,0.

Til bestemmelse af antistoffer af IgE-klassen mod græspollen tilsat-
tes 50 µl serum fra en høfeberpatient P eller fra en kontroldonor C
til 200 µl af en TNP-græspollenopløsning fortyndet 1:4000 i PBS
indeholdende 0,5% BSA og 0,02% Tween-20, og blandingen inkuberedes
derefter i 6 timer ved 20-24°C.

Polystyrenkuglerne belagt med anti-TNP-antistoffer vaskedes til
fjernelse af ikke-adsorberet anti-TNP-antistoffer og overførtes til
reaktionsblandingen af serum og TNP-pollenekstrakt. Efter 16 timers

inkubation ved 20-24°C fjernedes ikke-bundet materiale ved vask af kuglerne; bundne IgE-antistoffer til græspollen påvistes og kvantiteredes med et ^{125}I -mærket anti-IgE-reagens.

5

	<u>Høfeberpatient (P), fortyndinger</u>	<u>% binding af mærket anti-Ig-reagens</u>
	50 μl -	50,2
	50 μl - 1:25	35,5
	50 μl - 1:50	27,8
10	50 μl - 1:100	17,5
	50 μl - 1:200	11,6
	50 μl - 1:400	7,6
	50 μl - 1:800	4,6
	50 μl - 1:1600	3,1
15	50 μl - 1:3200	2,5
	50 μl - 1:6400	1,9
	50 μl - 1:12800	1,5
	50 μl (kontroldonor)	1,0

20

EKSEMPEL II

Glycoproteinet avidin har en høj affinitet for biotin ($K=10^{-15}\text{M}^{-1}$). Binding af avidin til en fast fase og kobling af biotin til et antigen gør det muligt at separere antigenbundet immunoglobulin og fri immunoglobulin.

Avidin kobledes kovalent til CNBr-aktiveret Sepharose-4B i overensstemmelse med kendte metoder; 3,5 mg avidin kobledes til 1 ml Sepharose; reaktionsproduktet suspenderedes i 350 ml PBS.

Biotin-græspollen fremstilledes ved at omsætte 1 mg græspollen i 0,5 ml PBS med 240 μg biotin-succinimid i 20 μl dimethylformamid i 4 timer ved 20-24°C.

35

Ikke-koblet og inaktiveret biotin-succinimid fjernedes ved dialyse mod PBS i 16 timer.

Til bestemmelse af antistoffer af IgE-klassen mod græspollen tilsat-

tes 50 μ l serum fra en høfeberpatient P eller fra en kontroldonor C til 50 μ l af en opløsning af biotin-græspollen fortyndet 1:100 i PBS indeholdende 0,5% BSA og 0,02% Tween-20 og inkuberedes derefter i 1 time ved 20-24°C. Derefter tilsattes 0,5 ml avidin-Sepharose-suspension og 250 μ l PBS, som indeholdt bovintserumalbumin og natrium-EDTA. Blandingen inkuberedes i 16-24 timer på et rotationsapparat.

Sepharose-proteinkomplekset separeredes fra suspensionen ved centrifugering. Ikke-bundet Ig fjernedes ved vask af Sepharosekuglerne med en 0,9% saltvandsopløsning.

Kvantitativ bestemmelse af bundet IgE udførtes ved tilsætning af 125 I-mærkede anti-IgE-antistoffer til suspensionen af Sepharose-proteinkompleks.

15

<u>Høfeberpatient (P), fortyndinger</u>	<u>% binding af mærket anti-Ig-reagens</u>
50 μ l - 1:25	32,7
50 μ l - 1:50	20,6
20 50 μ l - 1:100	15,1
50 μ l - 1:250	6,4
50 μ l - 1:500	4,9
50 μ l (kontroldonor)	0,5

25

30

35

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af antistoffer mod opløselige antigener i en vandig prøve, navnlig i legemsvæsker, såsom blodserum
5 eller blodplasma, ved hvilken fremgangsmåde prøven kontaktes med et antigen in vitro, hvorved antistoffer, hvis de er til stede, bindes til antigenerne, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et antigen, der er modificeret med en genkendelig gruppe, at det modificerede antigen er opløseligt i forsøgsprøven, således at der
10 sker en gensidig påvirkning mellem antigen og antistof i en homogen opløsning, at det modificerede antigen med bundet antistof, hvis dette er til stede, separeres fra opløsningen med et udfældningsmiddel eller et uopløseligt reagens, som vekselvirker med den genkendelige gruppe, og at ethvert bundet antistof derefter påvises
15 og/eller kvantiteres ved velkendte metoder.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der som den genkendelige gruppe anvendes en haptent, og at der som uopløseligt reagens anvendes anti-haptent-antistof koblet til en fast
20 fase.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at der som haptent anvendes en trinitrophenylgruppe.
- 25 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der som den genkendelige gruppe anvendes biotin og som uopløseligt reagens avidin koblet til et fastfasebæremateriale.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 2-4, k e n d e t e g n e t ved, at der
30 som fast fase anvendes plastkugler.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 2-4, k e n d e t e g n e t ved, at der som et fastfasebæremateriale anvendes en mikrotiterplade.
- 35 7. Fremgangsmåde ifølge krav 2-4, k e n d e t e g n e t ved, at der som et fastfasebæremateriale anvendes kemisk aktiverede, uopløselige polymerer.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at der

som uopløselig polymerer anvendes CNBr-aktiverede agarosekugler.

9. Kit til påvisning og bestemmelse af antistoffer rettet mod bestemte antigener i en homogen, vandig opløsning, hvilket kit er
5 egnet til brug ved fremgangsmåden ifølge kravene 1-8, k e n d e -
t e g n e t ved, at det indeholder et første reagens bestående af et
med en genkendelig gruppe modificeret, i vandig opløsning opløselig
antigen, et andet reagens bestående af et udfældningsmiddel eller et
10 uopløseligt reagens, som kan vekselvirke med den genkendelige
gruppe, samt et tredje reagens bestående af et mærket anti-Ig.

10. Kit ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at et eller flere
af reagenserne er frysetørret.

15

20

25

30

35