

56 85/90



52.287/MA

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

62091

K I V O N A T

Eljárás analitok kimutatására

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM,

Német Szövetségi Köztársaság

A bejelentés napja : 1990. 08. 29.

Unió elsőbbsége : 1989. 09. 01. (P 39 29 119.7)

Német Szövetségi Köztársaság

Az eljárásra jellemző, hogy a meghatározni kívánt analitot egy ismert mennyiségű, jelzett vagy immobilizált analittal versenyeztetik valamilyen receptor kötődési helyéért, mikellett a receptor legalább kétféle monoklonális antitest keveréke, melyek az analitokkal specifikus kötődésre alkalmasak és egyúttal a keresztreaktivitásuk egymástól különböző.

Földvári

5645/90



52.287/HA

62091

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÖGYVÉDI
& SZABADALMI IRODA
1081 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 133-3733

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY A

NSZ05

GOIN 33/577

Eljárás analitok kimutatására

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM,

NÉMET SZÖVETSÉGI KÖZTÁRSASÁG

Feltalálók:

dr. rer. nat. BAUMGARTNER Horst,

PENZBERG,

dr. rer. nat. GROL Michael,

FELDAFING,

dr. rer. nat. STAHL Peter,

BERNRIED,

NÉMET SZÖVETSÉGI KÖZTÁRSASÁG,

A bejelentés napja : 1990. 08. 29.

Unió elsőbbsége : 1989. 09. 01. (P 39 29 119.7)

NÉMET SZÖVETSÉGI KÖZTÁRSASÁG

A találmány analitoknak immunológiai módszerekkel történő kimutatására szolgáló eljárásra vonatkozik.

A klinikai diagnosztikában az immunoassay-elven alapuló kimutatási módszerek nagy jelentőségre tettek szert. Immunológiai eljárások segítségével igen sokféle anyagot lehet pontosan és specifikusan kimutatni. Ehhez olyan antitestek szükségesek, melyek nagyon nagy mértékben specifikusan komplexeket képesnek a kimutatni kívánt anyaggal, azonban hasonló szerkezetű vegyületekkel nem képesnek komplexeket. A specifikus antitestek megtalálása ezért nagyon lényeges része az új kimutatási eljárások kidolgozásának, illetve a már ismert módszerek tökéletesebbé tételének. Jelentős javulást hozott Koehler és Milstein eljárása, mellyel monoklonális antitesteket lehet készíteni. Amíg a monoklonális antitesteket produkáló hibridóma-sejtvonalak kialakítása önmagában véve semmiféle nehézséget nem okoz, addig a screenelési eljárás, mellyel azokat a mindenkori alkalmas sejtvonalakat választják ki, melyek a specifikus és nagy affinitással rendelkező antitesteket termelik, gyakran meglehetősen költségesek. Mennél magasabbak a monoklonális antitest tulajdonságaira vonatkozó követelmények, annál magasabbak lesznek a screenelés költségei is és bizonyos körülmények fennforgása esetén egyáltalán nem lehet egy megfelelően alkalmas, egyedi, monoklonális antitestet találni. Egy bizonyos antitesttel szemben főképpen a következő követelményeket támasztják: legyen az antitestnek egyfelől nagy affinitása, amivel a "saját" antigénjéhez vagy hapténjéhez kötődik, másfelől nagyfokú specifitása legyen, amivel az antitest felismeri ezt a "saját" antigént vagy

haptént és ezáltal a keresztreaktivitás alacsony mértékű lesz. Az antitest affinitása a mindenkori adottságokhoz, így például az analitkoncentrációhoz igazodik. A kívánt antitest "idegen" antigénekhez viszonyított keresztreaktivitásának egy bizonyos érték alatt kell lennie. Ezeket az értékeket úgy szokták megállapítani, hogy az antigének ne okozzanak a hibahatárt meghaladó változást a mindenkori kimutatási módszer mérési jelében.

Gyakran felmerül egy kívánság, amely affinitását és specifikusságát tekintve olyan ideális monoklonális antitestre irányul, ami nemcsak egyetlen teszthez lenne alkalmas, hanem legalábbis a legtöbb követelménynek eleget tenne, ha nem is minden pont tekintetében.

A technika állásához tartozó eljárás abból áll, hogy a tesztelési körülményeket (pH, sókoncentráció, hőmérséklet stb.) úgy változtatják, hogy az alkalmazott monoklonális antitesttel a keresztreaktivitásokat megtartják olyan mértékig, ami klinikai teszt szempontjából még eltűrhető. Ez az eljárás azonban időigényes és gyakran nem vezet el a kívánt eredményhez.

A fenti feladat megoldására eljárást dolgoztunk ki monovalens analitok immunológiai kimutatására a meghatározni kívánt analitnak valamilyen analittal egy receptor kötődési helyéért történő versenyztetése (konkurrációja) útján, melyre jellemző, hogy receptorként legalább kétféle monoklonális antitest keverékét alkalmassuk, melyek az analitokkal speci-

fikus kötődésre alkalmasak, minellett ezek keresztreaktivitása egymástól különböző.

Meglepő módon sikeresnek bizonyult a specifitási és affinitási követelményeket külön-külön nem kielégítő monoklonális antitestekből keveréket készíteni és ezzel a köz számára egy olyan tesztelési rendszert rendelkezésre bocsátani, melynek specifikussága az egyes anyagokkal szemben tökéletesebbé vált.

Kompetitív immunológiai kimutatási eljárások számára sokféle változat létezik, ezek általában véve ismertek. Monovalens analitek, különösen haptének számára rendszerint kétféle tesztelési elvet részesítenek előnyben. Nevezetesen : vagy valamilyen szilárd fázisra kötött receptor reagál a próbával és a jelzett analittal, vagy pedig a jelzett receptor reagál a próbával és a szilárd fázisra kötött analittal. A találmány szerinti megfelelő eljárásnál az antitestet rendszerint ekvimoláris vagy ennél kisebb mennyiségben alkalmazzuk.

A képződött komplexeket el lehet választani egymástól és a jelzések ismert módon kiértékelhetők. Minden eljárásváltozat számára a találmány szerinti eljárás javulást eredményez.

A mindenkori eljárástól függően a találmány szerinti antitestkeveréket jelzett receptorként, szilárd fázison kötött receptorként, agglutináló receptorként stb. alkalmazhatjuk. A találmány szerint alkalmazására kerülő antitestkeverékhez olyan mono-

klonális antitesteket választunk, melyek affinitása az optimális tartományba esik és csak kis mértékű keresztreakciót mutatnak, mivellett a keresztreaktivitás egy bizonyos előírt érték ("Sollwert") felett van. A keverékhez használt antitestek keresztreaktivitása egymástól különböző, ami azt jelenti, hogy az antitestek reakcióba lépnek a kimutatni kívánt anyaghoz hasonló, de attól mégis különböző vegyületekkel. Másképpen kifejezve : az egyik antitest keresztreakcióba lép olyan anyagokkal, melyekkel a másik antitest egyáltalán nem, vagy gyakorlatilag nem kimutathatóan reagál (és megfordítva). Egy antitest keresztreaktivitása egy bizonyos anyaghoz emellett nem abszolút, hanem relatív mérési értékű, ami a mindenkorí tesztrendszertől függ. Vonatkozási pont a meghatározni kívánt analit, melyre az antitest specifikusan kötődik. A mérési jelet, melyet az analittal történő reakciónál kapunk, 100 %-nak vesszük. Analit távollétében vagy jelenlétében mármost a keresztben reagáló anyagot különböző koncentrációkban a tesztoldathoz adjuk. A keresztben reagáló anyaggal esután egy mérési jelet kapunk, ami a tulajdonképpeni analit meghatározott mennyiségének felel meg. A leolvasást a hitelesítő görbe legpontosabb tartományában végessük. Ezt a jelet ugyancsak százalékban bejessük ki. Így például 10 %-os keresztreakció azt jelenti, hogy tízszeres mennyiségű keresztben reagáló anyagot kell alkalmazni, hogy ugyanakkora mérési jelet kapjunk, mint az analit egyszeres mennyiségével. Egy másik tesztrendszerben a keresztben reagáló anyagra nézve egy másik értéket határozhatunk meg. Az egy

tesztben megkívánt keresztreakciók (előírt értékek) függenek a mindenkori keresztben reagáló anyagnak az analízis viszonyított koncentrációviszonyaitól, ezért azok nagyon különbözők lehetnek.

A találmány szerinti eljáráshoz olyan monoklonális antitesteket alkalmazhatunk, melyek egy bizonyos anyagra vonatkoztatott keresztreaktivitása az felső előírt érték (Sollwert) háromszorosáig, előnyösen annak kétszereséig terjed. Ez az értéktartomány a kimutathatási határ és a mindenkori teszt számára még elfogadható hibahatár közé esik. A találmány értelmében legalább két monoklonális antitest keverékét alkalmazzuk, de kettőnél több monoklonális antitestfőleséget is össze lehet keverni. A viszony, melyben az egyes monoklonális antitestek a szóban forgó keverékben jelen vannak, affinitásukhoz és specifikusságukhoz igazodik. Rendszerint a legmérsékeltőbb keresztreaktivitású antitest szolgáltatja a legnagyobb részarányt. Az egyes antitestek viszonyát az adottságoknak megfelelően választjuk meg. Előnyösen két antitest keverékét alkalmazzuk, melyek aránya a 0,1 - 10 : 1 közötti tartományba esik.

Legalább két olyan antitest összekeverése révén, melyek különböző vegyületekkel savaró mellékreakciókba lépnek, összességében csökkenni fog a keresztreaktivitás. Ezen csökkenés emellett rendszerint egy higitási effektusból indul ki, úgy hogy itt nyilvánvalóan egy szinergetikus hatásfokozás van.

A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi, hogy olyan monoklonális antitesteket alkalmazzunk, melyek specifikusságukat tekintve nem ideálisak. Az ilyen tesztelésre csak részben alkalmas antitestek screenelése kevesebb kockázattal jár és ezért olcsóbb és gyorsabb. Két vagy több monoklonális antitestből álló keverék felhasználásával — melyek külön-külön és egymagukban tesztelésre nem alkalmasak — kielégítően specifikus tesztelési rendszereket tudunk a köz rendelkezésére bocsátani, minthogy különböző keresztreaktivitással rendelkező több antitest összekeverése által összességében egy olyan rendszert tudunk rendelkezésre bocsátani, ami a követelményeket kielégíti.

A találmányt a csatolt rajzokkal, valamint az alábbi példákkal részletesebben megmagyarázzuk :

Az 1. ábrán egy diagram szerepel, amelyre a 19. 6. 9. és az 1. 26. 18 antitestek különböző keverékeivel kapott keresztreaktivitásokat (szabványosítva) vittük fel;

A 2. ábrán egy diagram szerepel, amelyre a 19. 6. 9 és a 9B4. C2 antitestek különböző keverékeivel kapott keresztreaktivitásokat (szabványosítva) vittük fel;

A 3. ábrán egy diagram szerepel, amelyre a 8. 15. 1 és a 700 - 03 antitestek különböző keverékeivel kapott keresztreaktivitásokat (szabványosítva) vittük fel ;

A 4. ábrán egy diagram szerepel, amelyre a 2. 341. 115 és a 2. 93. 37 antitestek különböző keverékeivel kapott keresztreaktivitásokat (szabványosítva) vittük fel.

Mint hogy a klinikailag releváns keresztreakciók nagyon különbözők lehetnek — így például 0,1 % vagy 20 % — ez a dolog a százalékos értékekben történő grafikus ábrázolást nehezíti. Ezen nehézség elkerülése végett az 1.-4. ábrákon szereplő egyes antitestek maximális XR-jét (= keresztreaktivitás) minden esetben 1-nek vettük (a szaggatott vonal szabványosított XR-értéket fejez ki).

1. példa

Szteroidok koncentrációjának oldatból végzett meghatározása (a tesztelés elve)

Szteroidoknak pufferekben vagy testfolyadékokban (szérum, plazma, vizelet stb.) történő meghatározására enzimeszteket végzünk a kompetitív elv szerint.

Anyagok 1

- Rétegezetlen Luran-tubusok
- Streptavidin
- Szarvasmarha- szérumalbumin (RSA)
- Szubsztárumoldat : (100 mmól/liter foszfát-citrát-puffer, pH = 4,4 ,
3,2 mmól/liter nátrium-perborát,

- 9 -

1,9 mmól/liter ABTS (2,2'-azino-
-di-[3-etil-benzotriazolín-szulfon-
sav (6)]-diammóniumsó),

— Rétegsőpuffer : 200 mmól/liter nátrium-karbonát-
-puffer, pH = 9,6 ,

— Hígítópuffer : 50 mmól/liter nátrium-foszfát-puffer,
pH = 6,8 ; 0,3 % RSA,

— Mosóoldat : 0,9 %-os nátrium-klorid-oldat.

A MAK biotinilezését a J.A.C.S. 100 (1978) 3585 - 3590
szerint biotinnal végezzük, melyet N-hidroxí-szükszínimíd-
-biotinná alakítunk 10:1 arányban.

a) Meghatározás közvetlenül rétegesett tubusokkal

A tubusokat szobahőmérsékleten 1 óra hosszat inkubál-
juk egy rétegső pufferoldatban (0,2 mól/liter nátrium-
-karbonát/-bikarbonát, pH = 9,6) levő tisztított anti-
-antitest-oldattal (10 µg/liter). Az emlitett antitest
spontán kötődik a tubusfalra. A tubusokat ezután 50
mmól/liter foszfátpufferrel és 0,3 %-os albuminnal 15
percig utánkezeljük és mossuk.

A specifikus antitesteket a hígítópufferbe adjuk, majd
60 percen át inkubáljuk. Ezt követően hozzáadunk 600 µl
próbát (analit, keresztbe reagáló anyag stb.) és 500 µl
enzimkonjugátumot (ösztriol-POD, POD-aktivitás: 200
mU/ml) és ezt is 60 percig inkubáljuk. A másféle sztero-

idokhoz viszonyított keresztreakció vizsgálata végett a próbaoldathoz a vizsgálni kívánt szteroidból különböző mennyiségeket adunk. A mérési jel más szteroidok által okozott csökkenése keresztreakciót jelent, melynek mértékét a tulajdonképpeni analittal felvett standard-görbén lehet leolvasni. Egy további mosási lépés után a peroxidázaktivitást a szubstrátumoldat hozzáadásával határozzuk meg, a színezékanyag (1000 µl) kifejlődésére azonban ezt megelőzően további inkubálást végzünk, melynek ideje : 30 perc. A színátalakulás mérését fotométerrel végezzük 442 nm hullámhossznál.

b) Streptavidinnel rétegezett tubusokkal történő meghatározás

A tubusokat szobahőmérsékleten 1 órán át rétegezőpufferben levő streptavidinoldattal inkubáljuk, majd 50 mmól/liter foszfátpufferrel és 0,3 %-os albuminnal 15 percig utánkezeljük és mossuk.

A specifikus antitesteket a hígítópufferbe adjuk, majd 60 percen át inkubáljuk. Ezt követően hozzáadunk 600 µl próbát (analit, keresztbe reagáló anyag stb.) és 500 µl enziakonjugátumot (ösztriol-POD, POD-aktivitás : 200 mU/ml) és ezt is 60 percig inkubáljuk. A másféle szteroidokhoz viszonyított keresztreakció vizsgálata végett a próbaoldathoz a vizsgálni kívánt szteroidból különböző

ennyiségeket adunk. A mérési jel más szteroidok által okozott csökkenése keresztreakciót jelent, melynek mértékét a tulajdonképpeni analittal felvett standardgörbén lehet leolvasni. Egy további mosási lépés után a peroxidázaktivitást a szubsztárumoldat hozzáadásával határozzuk meg, a színezékanyag (1000 µl) kifejlődésére azonban ezt megelőzően további inkubálást végünk, melynek ideje : 30 perc. A színátalakulás mérését fotométerrel végezzük 442 nm hullámhossznál.

2. példa

MAK < Ösztriol > 19.6.9, valamint MAK < Ösztriol >
1.26.18 keverékek keresztreakcióinak meghatározása

Anyagok :

- E3-POD-konjugátum (Az E3-POD-konjugátumot úgy készítjük, hogy ösztriolt a 6-helyzetben hemiszukcináttal aktiváljuk és ezt követően szukcinimiddel észterezzük. A keletkezett észtert közvetlenül peroxidázzuk kapcsoljuk) (500 és 100 mU POD-aktivitás/ml)
- MAK < E3 > 19.6.9 (ECACC 89082503) biotinilezve
(100 µg/ml)
- MAK < E3 > 1.26.18 (ECACC 89082502) biotinilezve
(1000 µg/ml).

Az alkalmazott keresztbe reagáló anyagokat az alább felsorolt koncentrációkban alkalmazzuk:

Ösztriol (E3) : 0, 5, 10, 20, 40 ng/ml
(a tesztben 1:5 arányban hígítva)

Ösztradiol (E2) : 10, 100 ng/ml

Ösztetrol (E4) : 10, 100 ng/ml

E3 - 3-szulfát : 50, 100 ng/ml

E3-3-glükoronid : 50, 100 ng/ml

A meghatározás kivitelezését az 1. példa b) pontja szerint végezzük.

Az eredmények azt mutatják (1. ábra), hogy a MAK 19.6.9 ösztradiollal és ösztetrollal erősen keresztbereagált, míg a MAK 1.26.18 az ösztriol-3-szulfáttal és az ösztriol-3-glükoroniddal ad erős keresztreakciót. Az antitesteket különféle keverési arányokban alkalmaztuk. Különböző keverési arányoknál a mindenkor keresztreakciók megváltoznak. Ebből következően létezik egy optimális és egy előnyös tartomány.

3. példa

MAK < ösztriol > 19.6.9, valamint MAK < ösztriol > 9B4.C2 keverékek keresztreakcióinak meghatározása

A meghatározást az 1. példa a) pontjával analóg mód-

- 13 -

sszerrel végezzük. A MAK 9B4.C2 (az IPL, Interpharm Laboratories Ltd., Ness Ziona 76110, Israel, cég terméke) az 1.26.18-cal analóg módon erős keresztreakciót ad E3-3-asul-fáttal és E3-3-glükoroniddal.

Itt is létezik egy olyan MAK-koncentráció, melynél az IR jelentősen csökkent mértékű (lásd : 2. ábra).

4. példa

MAK < tesztoszteron > 8.15.1 , valamint MAK < tesztoszteron > 700 - 03 keverékek keresztreakcióinak meghatározása

Anyagok :

- Rétegezetlen Luran-tubusok
- Poliklonális juhantitest (IgG) egér-POC ellen (10 µg/ml; a tubusok rétegezéséhez)
- Protein C
- Tesztoszteron-POD-konjugátum (a tesztoszteron-POD-konjugátumot úgy készítjük, hogy a tesztoszteront a 3-helyzetben karboxi-metil-oxinnal aktiváljuk, majd szukcinimiddel észteresszük. A kapott észtert közvetlenül rákapcsoljuk a POD-ra (POD-aktivitás: 100 mU/ml))
- Tesztoszteron
- 4-Androsztén-3,17-dion = androszténdion

— 11-Keto-tesztoszteron

— MAK < tesztoszteron > 8.15.1 (BOACO 89082501)

— MAK < tesztoszteron > 700-03 (előállítója a Medix
Biotech Inc. cég, Foster City, CA 94904, USA ;
rendelési szám : T-700-03)

Az alkalmazott keresztben reagáló anyagok koncentrációi:

Tesztoszteron : 0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20,
40 ng/ml

Androszténdion : 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160,
320, 640 ng/ml

11-Keto-tesztoszteron : 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160,
320, 640 ng/ml

A meghatározást az 1. példa a) pontjával analóg módon
végezzük.

Eredmény :

A MAK 8.15.1 és a MAK 700-03 specifikus antitestek
tesztoszteronnal szemben, de relatív magas XR-értéket mutat-
nak mind androsztadiénhez mind 11-ketotesztoszteronhoz vi-
szonyítva.

A nem kapcsolt antitesteket különféle keverési arányok-
ban alkalmaztuk (lásd: 3. ábra).

A MAK-keverék tesztoszteronra vonatkoztatott XR-értéke

keveréssel befolyásolható, de ebben az esetben is található olyan keverési arány, melynél valamennyi keresztreakció a vártnál alacsonyabb érték alatt van (3. ábra).

5. példa

MAK <phenobarbital> 2.341.115, valamint MAK <phenobarbital> 2.93.37 keverékek keresztreakcióinak meghatározása

Anyagok:

- Rétegetlen Luran-tubusok
- Egér-Fcy -elleni poliklonális juhantitest (IgG)
(10 µg/ml; a tubusok rétegezéséhez)
- Grotein C
- Phenobarbital-POD-konjugátum (a phenobarbital-POD-konjugátumot úgy készítjük, hogy a phenobarbital-1-helyzetű nitrogénjét butiráttal aktiváljuk és szukcinimiddal észterezzük. A kapott észtert közvetlenül a POD-ra kapcsoljuk (POD-aktivitás: 100 mU/ml))
- Phenobarbital
- Secobarbital
- Amobarbital
- Pentobarbital
- Primidon
- MAK <phenobarbital> 2.341.115 (ECACC 90071903)

— MAK <phenobarbital> 2.93.37 (ECAAQ 90071904)

As alkalmazott keresztben reagáló anyagok koncentrációi:

Phenobarbital : 0, 7,8, 15,6, 31,3, 62,5, 125 ng/ml

Secobarbital : 0,2, 1 µg/ml

Amobarbital : 0,2, 1 µg/ml

Pentobarbital : 0,2, 1 µg/ml

Primidon : 1, 5 µg/ml

A meghatározást az 1. példa a) pontjával analóg módon végessük el.

Eredmény :

A MAK 2.341.115 és a MAK 2.93.37 specifikus antitestek fenobarbitállal szemben, ugyasakkor viszonylag nagy mértékű keresztreakciót mutatnak egyfelől a primidonhoz (MAK 2.341.115), másfelől a secobarbitalhoz, az amobarbitalhoz és a pentobarbitalhoz (MAK 2.93.37) viszonyítva.

As antitesteket különféle keverési arányokban alkalmaztuk (lásd : 4. ábra).

A MAK-keverék phenobarbitállal szembeni keresztreakcióját befolyásolni lehet a keveréssel. Itt is találhatunk olyan keverési arányt, melynél minden keresztreakció a várt értéknél alacsonyabb (4. ábra).

SZABADALMI IGENYPONTOK:

1. Eljárás monovalens analitok immunológiai kimutatására a meghatározni kívánt analitnak valamilyen ismert mennyiségű, jelzett vagy immobilizált analittal egy receptor kötődési helyéért történő versenyesztetése (konkurrációja) útján, assal jellemezve, hogy receptorként legalább kétféle monoklonális antitest keverékét alkalmassuk, melyek az analitokkal specifikus kötődésre alkalmasak, amellet ezek keresztreaktivitása egymástól különböző.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás assal jellemezve, hogy két monoklonális antitest keverékét alkalmassuk 0,1 — 10 : 1 arányban.

3. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti eljárás assal jellemezve, hogy olyan monoklonális antitesteket alkalmassunk, melyek egyféle vagy többféle anyaggal keresztreaktivitást mutatnak és a keresztreaktivitás abba a tartományba esik, amely a kimutathatósági határ és a mindenkor teszt szempontjából elfogadható határérték háromszorosa között van.

* rajzzal

A bejelentő helyett a
meghatalmasott :

14 oldal + 4 ásvaoldal

Földvári

B.S.O. & E.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÖTVÉDI
& SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DAKSZENTKÁZ 1. 10.
TELEFON: 183-3794

5685/90

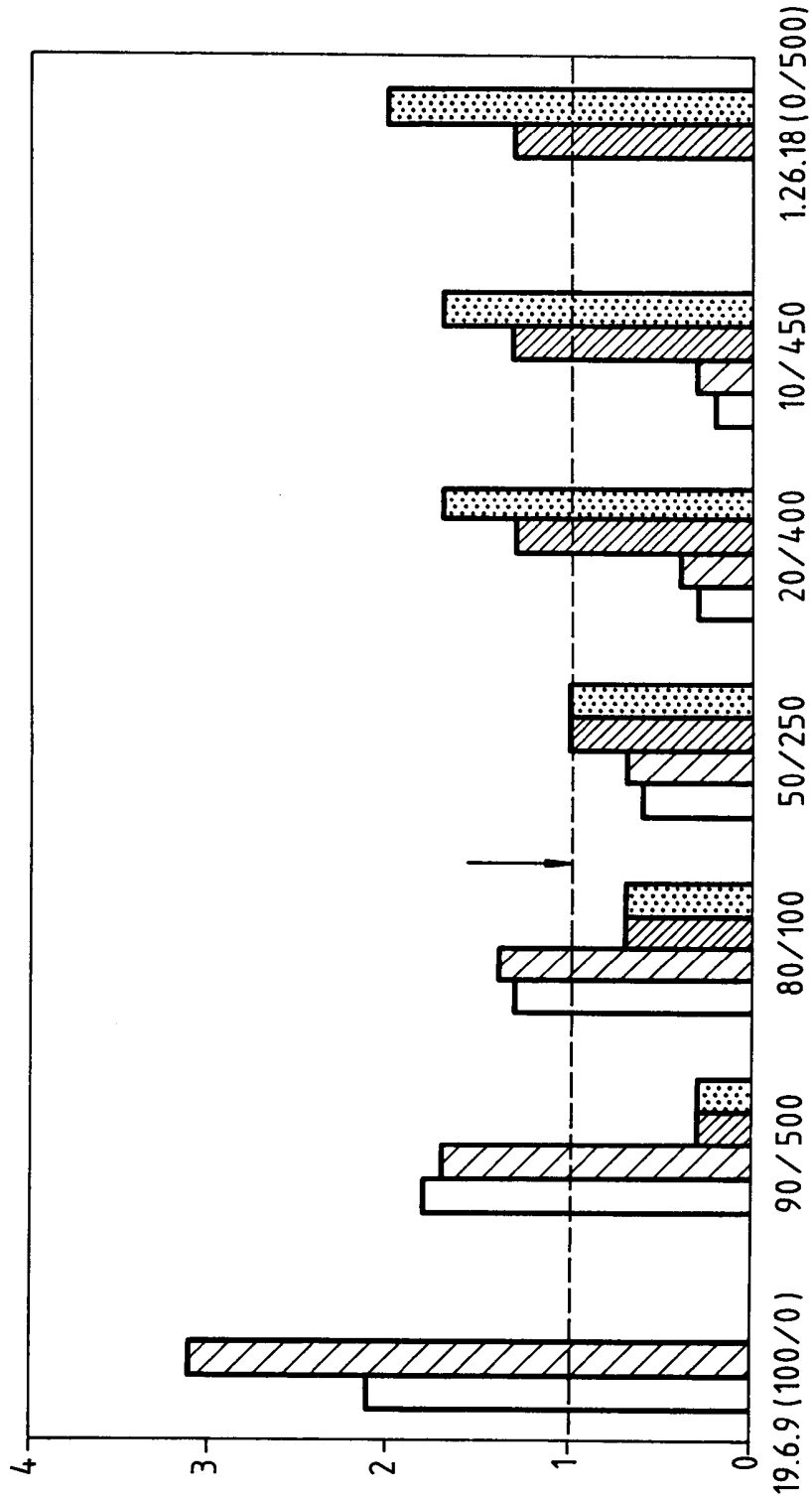
28173

62091

4/1

1.ÁBRA

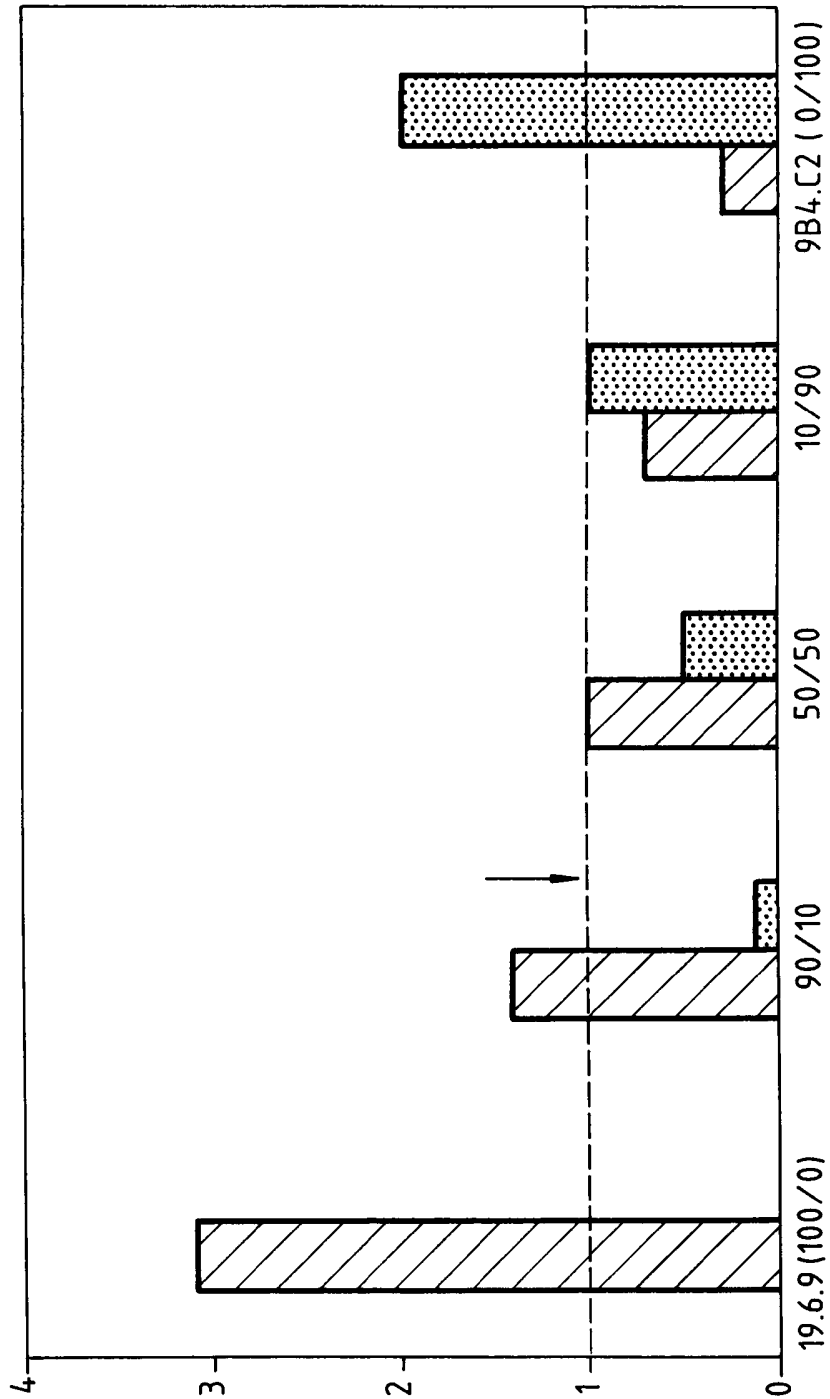
E2  E4  E3-3-S04  E3-3- 



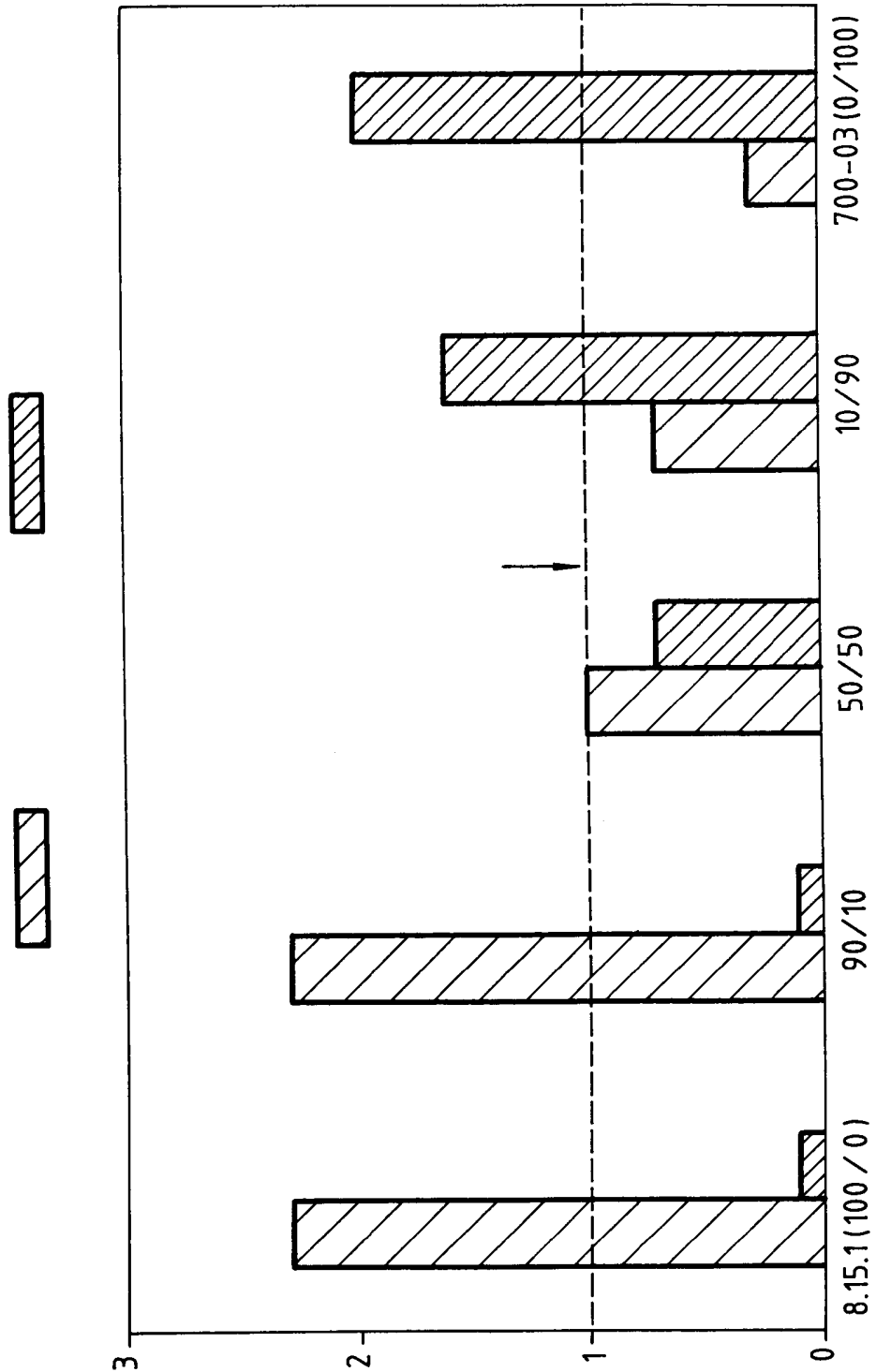
S.E.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZÜGYVÉDŐI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÉNYI U. 10.
TELEFON: 183/5781

2. ÁBRA

E4  E3-3- 



3. ÁBRA



4. ÁBRA

