

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144988 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

- (21) Ansøgning nr. 3730/72 (51) Int.Cl.³ G 01 N 33/54
(22) Indleveringsdag 27. jul. 1972
(24) Løbedag 27. jul. 1972
(41) Alm. tilgængelig 1. feb. 1973
(44) Fremlagt 19. jul. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 31. jul. 1971, 36097/71, GB

(71) Ansøger WARNER-LAMBERT COMPANY, Morris Plains, US.

(72) Opfinder John Michael Leach, GE: Brian John Ruck, AU.

(74) Fuldmægtig Internationalt Patent-Bureau.

- (54) Diagnostisk reagens for australsk
antigen eller dets antistof samt
fremgangsmåde til dets fremstil-
ling.

Opfindelsen angår et diagnostisk reagens for australsk antigen eller dets antistof såvel som en fremgangsmåde til fremstilling af dette reagens. Australsk antigen er også kendt som hepatitis-B-antigen, og det diagnostiske reagens ifølge opfindelsen skal finde anvendelse til påvisning i blodprøver af tilstedeværelsen af dette antigen eller af antistoffet dertil på en hurtig og pålidelig måde.

Australsk antigen, som er opdaget af Blumberg et al, J. Amer. Med. Assoc., 191, 541 (1965); Ann. Int. Med., 66,924 (1967), er til stede i blodet i en meget lille del af befolkningen, men bestemmelsen af det ved hjælp af hurtige og pålidelige midler er af den største vigtighed for, at man kan undgå til transfusion at anvende blod indeholdende dette antigen, som kan være årsag til såkaldt serum-hepatitis hos modtageren. Sådant hepatitis, der kan udvikles efter en lang inkubationstid, kan være alvorlig og endog i nogle tilfælde livsfarlig. Det er også vig-

DK 144988 B

tigt, at man kan påvise antistoffet til australsk antigen i personer eller dyr, der kan have været inficeret eller immuniseret med australsk antigen.

Der er derfor et behov for diagnostiske prøvemethoder, som er hurtige, følsomme, giver mulighed for rutinerepetition af et stort antal blodprøver, kræver anvendelse af en minimal mængde diagnostisk reagens samt er pålidelige, dvs. muliggør påvisning af antigenet (eller dets antistof) i enhver blodprøve (hvadenten det drejer sig om selve blodet, serum eller plasma) indeholdende dette stof, og som samtidig giver et minimalt antal "falske positive" resultater, dvs. falske tegn på tilstedeværelsen af antigenet (eller antistoffet).

Tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.059.514 og USA patentskrift nr. 3.551.555 omhandler anvendelsen af vandige suspensioner af syntetiske harpikspartikler som diagnostiske reagenser til immunokemiske bestemmelser. Disse partikler er belagt med henholdsvis en human gamma-globulin fraktion omfattende Cohn fraktion II og et indifferent protein belagt med et antigen eller et antistof.

Et diagnostisk reagens ifølge opfindelsen til påvisning af australsk antigen eller dets antistof, omfatter en vandig suspension af finkelte syntetiske harpikspartikler af i hovedsagen ensartet form og størrelse belagt henholdsvis enten med rensed antistof, som er specifikt med hensyn til australsk antigen, eller med selve det rensede australske antigen, og er ejendommeligt ved, at suspensionen også indeholder bestanddelene af normalt serum, dvs. serum, som hverken indeholder antistof, som er specifikt med hensyn til australsk antigen, eller selve det australske antigen, og som er taget fra samme art pattedyr som den art, fra hvilken antistoffet eller antigenet er udvundet.

Ifølge opfindelsen indeholder det diagnostiske reagens således bestanddelene af normalt serum (dvs. serum, som hverken indeholder det med hensyn til australsk antigen specifikke antistof eller selve det australske antigen), hvilket serum fås fra samme art pattedyr, som den fra hvilken serummet indeholdende antistoffet eller antigenet var opnået. Tilstedeværelsen af sådanne serumbestanddele formindsker væsentligt antallet af "falske positive" indikationer, når det diagnostiske reagens anvendes til påvisning af australsk antigen (eller antistof) i blodprøver. Hvis f.eks. normalt marsvineserum ikke inkorporeres i diagnostisk reagens indeholdende antistof fra marsvineantiserum, viser det sig, at ca. 10% humane sera, som ikke indeholder australsk antigen, bevirker agglutinerings af harpikspartiklerne, hvorpå er adsorberet antistoffet til australsk antigen. Dette skyldes sandsynligvis tilstedeværelsen af stoffer i humane sera, hvilke stoffer reagerer med andre materialer stammende fra de marsvineantisera, hvorfra antistoffet til australsk antigen var opnået. Hvis normalt marsvineserum inkorporeres, viser imidlertid kun mellem 1% og 3% af de humane sera agglutinerings af harpikspartiklerne ved fraværelse af australsk antigen i disse sera. Dette kan skyldes, at bestanddele i normal marsvineserum kan reagere med de omtalte stoffer i de humane

sera og således forhindre dem i at forårsage agglutinerings af harpikspartiklerne.

Det med hensyn til australsk antigen specifikke antistof fås fortrinsvis fra serum opnået fra pattedyr, f.eks. mennesker, får, geder eller marsvin, som indeholder antistoffet eller er blevet immuniseret med godt rensede australske antigen fra menneskeblod. Dette antiserum renses til fjernelse af dets restindhold af antistoffer med hensyn til humane serumproteiner eller andre stoffer, som ville forstyrre anvendelsen af det diagnostiske reagens til påvisning af australsk antigen.

Selve det australske antigen opnås fra serum fra mennesker, hvis blod indeholder antigenet. Antigenet ekstraheres fra serummet og renses, således at der ikke findes påviselige serumproteiner eller andre bestanddele, som ville forstyrre anvendelsen af det diagnostiske reagens til påvisning af antistoffet til australsk antigen.

Den vandige suspension indeholder fortrinsvis ca. 0,5% vægt/volumen harpikspartikler, men kan indeholde fra 0,1 til 3% vægt/volumen harpikspartikler. Til fremstilling af diagnostisk reagens til påvisning af australsk antigen indeholder suspensionen fortrinsvis ca. 0,05% vægt/volumen af antistoffet dertil adsorberet på harpikspartikler, men dette indhold kan også varieres i overensstemmelse med partikelkoncentrationen. Mængden af antistof bør være netop tilstrækkelig til at forhindre auto-sammenhobning af harpikspartikler. For runde polystyrenpartikler med diameter 0,16 μ har en mængde på mindre end 1/20 af vægten af 0,16 μ harpikspartikler vist sig at forårsage auto-sammenhobning. Mængder på over 1/10 bevirker formindsket følsomhed for det diagnostiske reagens, når det anvendes til påvisning af tilstedeværelse af antigen, men mængder på op til to gange vægten af 0,16 μ harpikspartiklerne kan anvendes.

Suspensionen indeholder fortrinsvis en stabilisator, som tilsættes efter adsorption af antigenet eller antistoffet på partiklerne, f.eks. et indifferent protein, såsom serumalbumin, i en koncentration på f.eks. 0,1% vægt/volumen. Et konserveringsmiddel, f.eks. natriumazid i en koncentration på 0,1% vægt/volumen, kan også være til stede.

Fortrinsvis anvendes ifølge opfindelsen ca. en rumfangsdel normalt serum pr. 20 til 50, f.eks. 35, rumfangsdele af den vandige suspension af harpikspartikler belagt med antistof eller antigen.

Det diagnostiske reagens for australsk antigen eller antistof ifølge opfindelsen kan fremstilles ved en fremgangsmåde, der er ejendommelig ved, at en vandig suspension af harpikspartikler sættes til en opløsning eller suspension af rensede antistof eller antigen, blandingen omrøres, indtil adsorptionen af antistof eller antigen på harpikspartiklerne er fuldstændig, hvorpå normalt serum, som hverken indeholder antistof, som er specifikt med hensyn til australsk antigen eller selve det australske antigen, tilsættes, og blandingen om nødvendigt yderli-

gere tilsættes stabiliseringsmiddel og/eller konserveringsmiddel. Omrøringer med henblik på blanding af bestanddelene foregår normalt ved stuetemperatur. Den anvendte serum kan om ønsket være fortyndet til lettelse af behandlingen. Suspensionen af harpikspartikler bør sættes til opløsningen eller suspensionen af antistof eller antigen, fremfor den omvendte fremgangsmåde, da der ved sidstnævnte fremgangsmåde kan forårsages irreversibel auto-sammenhobning af harpikspartikler.

Ved en fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af australsk antigen eller antistoffet dertil blandes en prøve af serum, plasma eller helt blod, eventuelt blandet med en vandig fortynder, med et passende (f.eks. lige så stort) rumfang diagnostisk reagens ifølge opfindelsen til påvisning af henholdsvis australsk antigen eller antistof og blandes fortsat i mindst to minutter, fortrinsvis fra fem til ti minutter. Hvis australsk antigen (eller antistoffet dertil) er til stede i prøven, så sker der agglutinerings af harpikspartiklerne, f.eks. polystyrenpartiklerne, til dannelse af synlige agglomerater. Hvis der ikke kan ses agglomerater inden fem minutter, indikerer dette fraværelse af australsk antigen (eller antistoffet dertil) i prøven.

Ved en alternativ fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af antistoffet til australsk antigen omrøres prøven med et standardvolumen rensede opløsning eller suspension af australsk antigen fra humant blodplasma, diagnostisk reagens for australsk antigen tilsættes, og blandingen omrøres et lignende tidsrum. Agglutinerings af harpikspartiklerne indikerer så fraværelse af antistof i prøven. Hvis harpikspartiklerne ikke agglutinerer i løbet af fem minutter, indikerer dette tilstedeværelse af antistof i prøven, idet sådant antistof så har reageret med tilsat antigen og således forhindret påfølgende agglutinerings af harpikspartiklerne med antigenet.

Hvis prøven består af helt blod, må den først behandles til lyserings af cellerne i den og til forhindring af koagulering, før den afprøves til påvisning af tilstedeværelsen af australsk antigen eller antistoffet dertil. Til dette formål må den behandles med et vandigt fortyndingsmiddel indeholdende et ikke-ionogent overfladeaktivt middel af den polyoxyethylerede alkylphenol-type, f.eks. isooctylphenoxy-polyoxyethyl-ethanol ("Triton X-100" fra Rohm & Haas Co., hvor "Triton" er et i Danmark registreret varemærke), og natriumcitrat.

Hvis prøven består af blodplasma, må den indeholde et antikoaguleringsmiddel, f.eks. et vilkårligt standardantikoaguleringsmiddel, såsom natriumcitrat, og prøven behandles med fordel også med samme vandige fortyndingsmiddel som for helt blod, hvilket middel indeholder et ikke-ionogent overfladeaktivt middel, til lyserings af eventuelle resterende celler, som kan være til stede i prøven.

En passende pakning til udførelse af fremgangsmåderne til påvisning af australsk antigen eller antistoffet dertil omfatter fortrinsvis et reagensglas indeholdende en passende mængde diagnostisk reagens ifølge opfindelsen og et reagensglas indeholdende en lignende mængde af en fortyndingsopløsning indeholdende et lyseringsmiddel sammen med et antikoaguleringsmiddel til lysering og fortynding af helt blod og plasmaprøver. Der kan også forefindes sorte præparatglas enten af glas eller plast, hvorpå prøverne kan udføres.

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af følgende eksempel.

Fremstilling af diagnostiske reagens

Eksempel

En 40% vægt/volumen suspension af polystyrenkugler fremstillet af Styrene Products Limited (produkt nr. 24016) med en diameter på 0,16 μ og solgt af BDH Chemical Limited fortyndes til 5% med glycinforpufret saltvand og steriliseres ved tilsætning af β -propiolacton under pH-regulering. Den sættes derpå til ni rumfang passende fortyndet, rensed marsvineserum fra dyr, som er immuniseret med australsk antigen. Polystyrensuspensionen tilsættes langsomt under omrøring, og omrøringen fortsættes i 30 minutter. Polystyrenkuglerne centrifugeres, vaskes en gang i centrifugen med forpufret saltopløsning og resuspenderes til det oprindelige rumfang i forpufret saltopløsning. Okse-serumalbumin (1% vægt/volumen) tilsættes til stabilisering af suspensionen af polystyrenkugler, og omrøringen fortsættes i 30 minutter. 1/10 Rumfang fortyndet normalt serum fra ikke-immuniserede marsvin (fortyndet 1:3,5 med glycinforpufret saltvand) tilsættes, og blandingen omrøres igen i 30 minutter. Til slut rystes blandingen voldsomt til spredning af eventuelle partikelagglomerater. Alle anvendte opløsninger steriliseres ved filtrering og indeholder 0,1% natriumazid som konserveringsmiddel. Produktet holdes ved 4°C, ved hvilken temperatur det er stabilt i mindst tre måneder.

Beskaffenheden af en batch diagnostisk reagens afprøves med mindst 50 prøver med humant serum indeholdende forskellige kendte mængder australsk antigen. Denne beskaffenhed sammenlignes med beskaffenheden af standardprøver for australsk antigen (gel diffusion og immunoelktrophorese) over for de samme prøver, og man bør få i det mindste ensartet følsomhed. Selektiviteten vurderes over for mindst 100 prøver med humant serum og blodprøver, som vides ikke at indeholde australsk antigen. Ikke mere end 3% af prøverne bør så give en positiv reaktion.

Det i eksemplet anvendte rensede marsvineantiserum fremstilles som følger:

Marsvin immuniseres med australsk antigen udvundet og rensed fra prøver af humant plasma ved isopycnisk binding i en cæsium-chlorid- eller kalium-bromid-gradient i en zonecentrifuge efterfulgt af indstillet zonecentrifugering i en

sucrose-gradient. En primær immunisering med antigen i Freund's fuldstændige tilsætningsstof i foden efterfølges af to intraperitoneale podninger af antigen uden tilsætningsstof. Efter samling af serum opnået fra marsvinene fjernes resterende antistof mod humane serumproteiner om nødvendigt ved kontakt mellem antiserummet og normalt humant serum polymeriseret med ethyl-chlorformiat. Serummet renses så ved bundfældning med 14% vandig natriumsulfat, dialyseres mod vandig fosfatforpufret saltvand og kan om ønsket opvarmes til 56°C i 30 minutter til ødelæggelse af komplement. Natriumazid (0,1%) sættes til som konserveringsmiddel. Til anvendelse ved fremstilling af det diagnostiske reagens fortyndes antiserummet passende. Den optimale fortynding udvælges ved fremstilling af små hold diagnostisk reagens med forskellig fortynding af antiserummet og afprøvning af disse med nogle prøver humant serum, som vides at indeholde australsk antigen. Den fortynding, som overtrukket på harpikspartiklerne giver de bedste resultater med prøverne, udvælges til fremstilling af det diagnostiske reagens. Normalt ligger den optimale fortynding mellem 1:20 og 1:100.

P A T E N T K R A V

1. Diagnostisk reagens for australsk antigen eller dets antistof, hvilket reagens omfatter en vandig suspension af findelte syntetiske harpikspartikler af i hovedsagen ensartet form og størrelse belagt henholdsvis enten med rensset antistof, som er specifikt med hensyn til australsk antigen, eller med selve det rensede australske antigen, k e n d e t e g n e t ved, at suspensionen også indeholder bestanddelene af normalt serum, dvs. serum, som hverken indeholder antistof, som er specifikt med hensyn til australsk antigen, eller selve det australske antigen, og som er taget fra samme art pattedyr som den art, fra hvilken antistofet eller antigenet er udvundet.

2. Diagnostisk reagens ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at suspensionen indeholder ca. 1 rumfangsdel normalt serum pr. 20-50 rumfangsdele af suspensionen.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af et diagnostisk reagens ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at en vandig suspension af harpikspartikler sættes til en opløsning eller suspension af rensset antistof eller antigen, blandingen omrøres, indtil adsorptionen af antistof eller antigen på harpikspartiklerne er fuldstændig, hvorpå normalt serum, som hverken indeholder antistof, som er specifikt med hensyn til australsk antigen eller selve det australske antigen, tilsættes, og blandingen om nødvendigt yderligere tilsættes stabiliseringsmiddel og/eller konserveringsmiddel.

Fremdragne publikationer:

DE offentliggørelsesskrift nr. 2059514

SE fremlæggelsesskrift nr. 328669

US patent nr. 3551555.