

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 158481 B



(21) Patentansøgning nr.: 1906/82

(51) Int.Cl.⁵ G 01 N 33/53

(22) Indleveringsdag: 28 apr 1982

(41) Alm. tilgængelig: 03 nov 1982

(44) Fremlagt: 21 maj 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 02 maj 1981 JP 67333/81

(71) Ansøger: *MITSUBISHI Kasei Corporation; 5-2, Marunouchi 2-chome, Chiyoda-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Satoshi *Tsutsui; JP, Tadimitsu *Sudo; JP, Michio *Ito; JP

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Fremgangsmåde til analyse af antistoffer samt reagens dertil

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4148869

(57) Sammendrag:

1906-82

En prøve, der indeholder de antigener eller antistoffer, der skal analyseres, behandles med en polyanion, der er opløselig i reaktionsmediet, og den således behandlede prøve anvendes til antigen-antistofreaktionen. Et reagens til analyse af en antigen-antistofreaktion indeholder en polyanion og et reaktionsmedium.

DK 158481 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til analyse af antigen-antistofreaktioner og et reagens dertil.

Immunologiske reaktioner har høj specificitet, idet en reaktion optræder nøjagtigt og selektivt, hvilket er én af deres fremtrædende
5 egenskaber, og de anses for en vigtig medicinsk testmetode.

For tiden vækker mange in vivo-reaktioner megen opmærksomhed i forhold til antigen-antistofreaktioner, især inden for medicinen og sundhedsvidenskaberne, og de analyseres og undersøges med det formål at fremme sundhedstilstande, behandle sygdomme og lignende. Hvad
10 angår in vitro-reaktioner, foretages immunokemisk undersøgelse til- lige intenst på grundlag af prøver, der afspejler in vivo-betingel- ser, og en del deraf har allerede fundet praktisk anvendelse i ruti- nemæssige medicinske tests. Typiske analysemetoder, der er kendt som særdeles følsomme analysesystemer, omfatter radioimmunoassay (RIA),
15 latexagglutineringsassay med nær-infrarød turbidimetri (LPIA), en- zymimmunoassay (EIA), fluorimmunoassay og nephelometri, der anvender lysets spredning. Der er hidtil blevet udført mange immunologiske reaktioner, hvor antigener eller antistoffer i prøver påvises med et reagens, der udover den vandige fase omfatter bærermatrixer såsom
20 biologiske bærere, fx erythrocytter eller bakterier og latexpartikler af syntetiske organiske polymerbærere, der kan gøres følsomme med et egnet antistof eller antigen.

Det er kendt, at immunologiske analysemetoder, som kræver uopløselig- hed af et antigen-antistofkompleks som en integreret del af analysen,
25 kan forbedres ved til det testmedium, i hvilket uopløseligheden ønskes øget, at sætte en vandig reagensopløsning indeholdende fra omkring 3 til 6 vægtprocent af en blanding af polyethylenglycol og et non-ionisk overfladeaktivt stof, hvilken reagensopløsning har en kalkuleret HLB-værdi (Hydrofil-Lipofil-Balance) på omkring 0,7 til
30 1,7.

Ved den forøgede uopløselighed nedsættes reaktionstiden, hvilket giver en analyseprocedure med stor testspændvidde og sensitivitet.

Det problem, der løses ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, er et andet, nemlig at begrænse ikke-specifikke reaktioner, hvorved analysens specificitet (til forskel fra sensitivitet) øges.

5 Legemsvæsker, der afspejler aktiviteter af in vivo-tilstande, har en lang række bestanddele og fysiske egenskaber. Af denne grund kan mange immunologiske reaktioner ikke helt gøre sig fri af ikke-specifikke reaktioner, der kan siges at være bireaktioner, som er uafhængige af antigen-antistofreaktionen. Som modforholdsregel mod
10 sådanne ikke-specifikke reaktioner er der i mange tilfælde blevet anvendt fremgangsmåder såsom tilsætning af kaolin eller et tilsvarende adsorberende stof eller ekstraktion for at fjerne eller neutralisere de relevante ikke-specifikke faktorer. Skønt nogle af disse behandlinger er effektive, er det nødvendigt at foretage en detal-
15 jeret undersøgelse af hver antigen-antistofreaktion, og de indebærer mange vanskeligheder i deres praktiske anvendelse.

Der er blevet foretaget forskellige undersøgelser med det formål at eliminere de ovennævnte ulemper ved de kendte antigen-antistofreaktioner, og det har vist sig, at hvis reaktionen i analysen af anti-
20 gen-antistofreaktionen udføres med en prøve, der er blevet behandlet med en polyanion, forbedres både udvindingen af stoffet, der skal påvises, og analysens nøjagtighed, hvorved fås mere nøjagtige analyseværdier af antigenet eller antistoffet, hvorved den foreliggende opfindelse udføres. Den foreliggende opfindelse angår således en
25 fremgangsmåde til analyse af en antigen-antistofreaktion, hvor et antigen eller antistof, der skal analyseres, omsættes med det tilsvarende antistof eller antigen i et reaktionsmedium, hvilken metode er ejendommelig ved, at en prøve, som indeholder det antigen eller antistof, der skal analyseres, behandles med en polyanion, der er
30 opløselig i reaktionsmediet, og den således behandlede prøve anvendes til reaktionen. Opfindelsen angår yderligere et reagens til analyse af en antigen-antistofreaktion, som indeholder en polyanion og et reaktionsmedium.

De polyanioner, der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er naturlige eller syntetiske polymerer, hvilke stoffer har
35

flere sulfonylanioner eller carboxylanioner, og som er opløselige i reaktionsmediet, der anvendes i antigen-antistofreaktionen.

Specifikke eksempler på disse polyanioner omfatter dextransulfat, heparin, polystyrensulfonsyre, cellulosephthalat-acetat, hyaluronsyre
5 og chondroitinsulfat.

I overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen behandles en prøve, der indeholder det antigen eller antistof, der skal analyseres, med polyanionen, hvorefter prøven udsættes for antigen-antistofreaktionen med det tilsvarende antistof eller antigen i reaktionsme-
10 diet.

Behandlingen med polyanionen kan udføres ved, at

1. udføre antigen-antistofreaktionen i det medium, hvori polyanionen er blevet inkorporeret, eller
2. behandle prøven med en fast eller flydende fase, der indeholder
15 polyanionen, før antigen-antistofreaktionen (i det sidste tilfælde kan den således behandlede antigen- eller antistofholdige prøve udsættes for antigen-antistofreaktionen, efter at polyanionen er blevet fjernet derfra, men sædvanligvis udsættes den for reaktionen, medens den indeholder polyanionen).

20 De reaktionsmedier, der egner sig til anvendelse i antigen-antistofreaktionen, er vandige medier, herunder fx vand, en saltopløsning og pufferopløsninger, der kan indeholde ét eller flere tilsætningsstoffer udvalgt blandt stabiliseringsmidler, konserveringsmidler, chelateringsmidler og overfladeaktive midler.

25 Pufferopløsningen omfatter glycinpuffere, phosphorsyrepuffere, citronsyrepu-
fuffere, barbitalpuffere, boratpuffere, tris[tris(hydroxymethyl)aminomethan]saltsyrepu-
fuffere, tris-malatpuffere og ammoniumpu-
fuffere.

30 Stabiliseringsmidlerne omfatter fx aminosyrer, polypeptider og proteiner, som ikke deltager i den påtænkte immunologiske reaktion, og de er sædvanligvis til stede i en koncentration på 0,001-1 vægtprocent, fortrinsvis 0,05-0,6 vægtprocent.

Foretrukne eksempler på konserveringsmidler omfatter natriumazid og merthiolat.

Foretrukne eksempler på chelateringsmidler omfatter ethylendiamintetraeddikesyre, nitrilotrieddikesyre og cyclohexandiamintetraeddikesyre.

Som overfladeaktivt middel foretrækkes sædvanligvis ikke-ioniske overfladeaktive midler.

Reaktionsmediets pH bør ligge inden for det sædvanlige pH-område, der anvendes til antigen-antistofreaktioner, og der anvendes sædvanligvis en pH på ca. 5-10.

Koncentrationen af polyanionen i reaktionsmediet er sædvanligvis ikke større end 5 vægtprocent, fortrinsvis 0,001-0,5 vægtprocent.

En højere koncentration kan forårsage, at reaktionen bliver ustabil i tilfælde af visse analysesystemer. Men ved en lavere koncentration nedsættes den inhiberende virkning mod de såkaldte ikke-specifikke reaktioner, der vanskeliggør analysen og gør det umuligt at opnå nøjagtige analyseværdier, på grund af en forøget inhiberende virkning forårsaget af faktorer i serumprøven ud over reaktionen med det tilsvarende antigen, hvilket resulterer i en forringet nøjagtighed af analysen.

De antigener, der tjener som et stof, som skal analyseres, og som reaktant, omfatter forskellige antigener såsom fx proteiner, polypeptider, steroider, polysaccharider, lipider, pollen, støv og haptener. Antistofferne omfatter fx sådanne proteiner, som er antistoffer mod de ovennævnte antigener.

Ved analysen af en antigen-antistofreaktion ifølge opfindelsen kan anvendes et hvilket som helst kendt analysesystem. Således kan der enten anvendes de såkaldte opløsningssystemer, hvor både det stof, der skal analyseres, og reaktanten er opløselige i reaktionsmediet, eller de såkaldte bærersystemer, hvor reaktanten er bundet til en

partikelformig bærer, der i det væsentlige er uopløselig i reaktionsmediet, dvs. den partikelformige bærer gøres følsom med reaktanten. Specifikke eksempler på de antigen-antistofreaktioner, der kan analyseres i henhold til fremgangsmåden ifølge opfindelsen, omfatter

5 sådanne reaktioner, som forekommer i radioimmunoassay, latexagglutinerung med nær-infrarød turbidimetri, enzymimmunoassay, fluorimmunoassay, immunonephelometri, der anvender lysspredning, erythrocytagglutinerung og latexagglutinerung. Især anvendes fremgangsmåden ifølge opfindelsen i sådanne analysesystemer som latexagglutinerung

10 med nær-infrarød turbidimetri, som fx kan udnytte en omvendt passiv agglutinerung.

I henhold til fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan ikke-specifikke reaktioner, som kan opstå i antigen-antistofreaktioner, forhindres, og der kan opnås mere nøjagtige analyseværdier.

15 Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler.

EKSEMPEL 1

Dette eksempel viser latexagglutinerung med nær-infrarød turbidimetri.

Til 50 μ l serum fra et sundt menneske, hvilket serum ikke indeholder

20 mere end 2 ng/ml α_1 -fetoprotein (AFP), sættes 50 μ l af en opløsning, der indeholdt 1 μ g/ml AFP, og derefter 100 μ l bovint serumalbuminsaltopløsning, der indeholdt dextransulfat, for at få en testopløsning. Til 50 μ l af testopløsningen sættes 50 μ l af et latexreagens, der blev gjort følsomt med anti-AFP-antistof, og 200 μ l af en pufferopløsning, og ændringen af turbiditet i en nær-infrarød stråle ved

25 940 nm blev målt under omrøring. Prøvens analyseværdi blev udlæst på en standardkurve, og udbyttet blev beregnet. Resultaterne er vist i tabel 1 nedenfor sammenlignet med resultaterne for et polyanionfrit reaktionssystem som kontrol.

30 Som det fremgår af tabel 1, fås en væsentlig forbedring af udbyttet ($P < 0,01$) ved tilsætning af dextransulfat (ved en slutkoncentration

på 0,1 vægtprocent), og variationskoefficienten (CV) blev også væsentligt forbedret. Udbyttet af hvert forsøg er den relative værdi af det vundne udbytte, idet det normale samlede serum fra ti klare, turbiditetsfri prøver antager værdien 100.

5 EKSEMPEL 2

Den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde blev gentaget med undtagelse af, at polyanionen var polystyrensulfonsyre i en slutkoncentration på 0,2 vægtprocent. Resultaterne er ligeledes vist i tabel 1, hvoraf det fremgår, at der blev opnået en forbedring af variationskoefficienten.

10 EKSEMPEL 3

Den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde blev gentaget med undtagelse af, at der anvendtes heparin som polyanion i en slutkoncentration på 0,1 vægtprocent. Som vist i tabel 1 fås en udbytteforbedring.

EKSEMPEL 4

15 Den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde blev gentaget med undtagelse af, at der anvendtes cellulosephthalat-acetat som en polyanion i en slutkoncentration på 0,1 vægtprocent. Som vist i tabel 1 blev udbyttet forbedret.

Tabel 1

		Udbytte (vægtprocent)		
		Prøve		
		Kontrol	Eksempel 1	
		uden	dextran-	
		polyanion	sulfat	
Forsøg nr.	Hæmo-lyse	Turbi-ditet		
1	-	+++	93,7	101,4
2	-	+++	86,8	88,8

	3	-	+++	83,8	105,8
	4	++	+++	88,0	96,5
	5	-	+++	76,7	86,6
	6	-	+	84,6	98,1
5	7	-	+	90,7	103,3
	8	-	+	85,9	103,0
	9	-	+	72,9	96,2
	10	-	+	100,6	100,6
	11	-	+	105,1	100,4
10	12	++	+	92,7	101,0
	13	+	+	96,5	99,1
	14	+	+	92,4	97,5
	15	-	+	100,0	100,2
	16	+	+	79,6	93,1
15	17	-	-	95,6	100,1
	18	+	-	81,1	93,2
	19	+++	-	82,6	85,5
	20	-	-	92,0	105,1
<hr/>					
20	Gennemsnit			89,07	97,78
	Standardafvigelse			±8,39	±5,76
	CV (%)			9,42	5,89

Udbytte (vægtprocent)

25

Forsøg nr.	Eksempel 2	Eksempel 3	Eksempel 4
	polystyren- sulfonsyre		cellulose- phthalat- acetat
30			
	1	96,2	98,3
	2	88,9	88,9
	3	87,2	82,9
	4	92,2	93,2
35	5	82,3	85,2
	6	87,8	91,2
	7	93,5	98,5
	8	85,9	91,7

	9	85,0	82,4	91,7
	10	100,0	99,8	101,7
	11	89,9	100,2	111,2
	12	94,3	102,0	98,4
5	13	97,8	100,0	101,2
	14	95,2	99,0	101,2
	15	97,5	102,0	101,5
	16	80,4	85,0	88,4
	17	95,5	99,4	100,9
10	18	87,5	85,5	93,5
	19	83,7	87,0	86,0
	20	97,2	102,0	98,0
<hr/>				
	Gennemsnit	90,1	92,92	95,18
15	Standard-			
	afvigelse	±6,33	±7,21	±7,07
	CV (%)	7,02	7,76	7,43
<hr/>				

EKSEMPEL 5

20 Dette eksempel viser virkningen af tilsætningen af dextransulfat på erythrocytagglutinerings, hvilket kan ledsages af en pseudoreaktion i visse prøver, hvilket resulterer i forkert aflæsning.

En AFP-holdig prøve blev fortyndet 20 gange med en opløsning af dextransulfat i en fosfatpuffer (pH-værdi 6,4), der blev fremstillet på en sådan måde, at slutkoncentrationen af dextransulfat var 0,001 vægtprocent, og 100 μ l af den fortyndede prøve sættes til en suspension af fåreerythrocytter, der var gjort følsomme med anti-AFP-antistof. Blandingen henstod i 2 timer. De prøver, der ikke indeholdt mere end 50 ng/ml AFP, viste ringformet agglutinerings, hvorimod de 25 prøver, der ikke indeholdt mindre end 100 ng/ml AFP, enten viste tilsyneladende større ringformet eller måttelignende agglutinerings. Når det samme forsøg blev udført med prøver af kendte koncentrationer, forekom der færre pseudoreaktioner, selv med særdeles uklare 30 prøver, hvilket letter bedømmelsen.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til analyse af en antigen-antistofreaktion, hvor et antigen eller antistof, der skal analyseres, omsættes med det tilsvarende antistof eller antigen i en reaktionsblanding,
- 5 k e n d e t e g n e t ved, at en prøve, som indeholder det antigen eller antistof, der skal analyseres, behandles med naturlige eller syntetiske polymerer med flere sulfonylanioner eller carboxylanioner, og som er opløselige i reaktionsmediet, og den behandlede prøve anvendes til udførelse af reaktionen.
- 10 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at reaktionen udføres i nærværelse af naturlige eller syntetiske polymerer med flere sulfonylanioner eller carboxylanioner, og som er opløselige i reaktionsmediet.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2,
- 15 k e n d e t e g n e t ved, at den naturlige eller syntetiske polymer med flere sulfonylanioner eller carboxylanioner, og som er opløselig i reaktionsmediet, er dextransulfat.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
- 20 k e n d e t e g n e t ved, at antigen-antistofreaktionen er agglutinerings-
ning.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at agglutinerings-
ning er omvendt passiv agglutinerings-
ning.
6. Reagens til anvendelse ved analyse af en antigen-antistofreaktion ved fremgangsmåden ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5,
- 25 k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder et reaktionsmedium til antigen-antistofreaktionen og naturlige eller syntetiske polymerer med flere sulfonylanioner eller carboxylanioner, og hvilke polymerer er opløselig i reaktionsmediet.

7. Reagens ifølge krav 6,
k e n d e t e g n e t ved, at reaktionsmediet er et vandigt medium.

8. Reagens ifølge krav 6,
k e n d e t e g n e t ved, at reaktionsmediet er en pufferopløsning.