



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **M 159964**

(51) Int. Cl.⁴ G 01 N 33/546, 33/53

(21) Patentsøknad nr. 821448

(22) Inngivelsesdag 30.04.82

(24) Løpedag 30.04.82

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **MITSUBISHI CHEMICAL
INDUSTRIES LIMITED,
5-2, Marunouchi 2-chome,
Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.**

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(85) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 03.11.82

(44) Utlegningsdag 14.11.88

(72) Oppfinner **SATOSHI TSUTSUI, Yamato-shi, Kanagawa,
MICHIO ITO, Yokohama-shi, Kanagawa,
TADAMITSU SUDO, Sagami-hara-shi,
Kanagawa, Japan.**

(74) Fullmektig A/S Oslo Patentkontor
Dr.ing. K.O. Berg, Oslo.

(30) Prioritet begjært 02.05.81, JP, nr. 67332/81.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **IMMUNOKJEMISK REAGENS.**

(57) Sammendrag Et partikkelformig reagens for immunologiske reaksjo-
ner omfatter en partikkelformig bærer sensibilisert
med et antigen eller et antilegeme, hvilken bærer er
suspendert i et vandig medium med en elektrisk led-
ningsevne på 5,0 mS/cm eller mindre.

(56) Antførte publikasjoner USA (US) patent nr. 4164558, 4062936, 3946105.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et reagens som angitt i krav 1's ingress. I de senere år har slike reagenser blitt stadig viktigere innen felt såsom medisin, biokjemi, hygiene og epidemiologi for å bestemme sporsubstanser, spesielt antigener og antistoffer. En tidligere kjent framgangsmåte som har fått en utbredt anvendelse omfatter å reagere et antigen eller et antistoff med latexpartikler sensibilisert med det passende antistoff eller antigen på en glassplate og visuelt observere agglutineringsgraden. Med denne framgangsmåte er det imidlertid vanskelig å utføre analysen med en høy grad av nøyaktighet. Det er nylig foreslått en modifikasjon av det ovenfor nevnte analysesystem for antigener eller antistoffer ved anvendelse av sensibiliserte latexpartikler ved at hastigheten med hvilken turbiditeten for bæremediet (supernatanten) for latexpartiklene avtar etter reaksjon kan måles optisk ved utførelse av analysen, idet man utnytter det fenomen at omsetningen mellom en antigen- eller antistoffsensibilisert latex med et antistoff eller antigen forårsaker agglutinerings av latexpartiklene (se f.eks. Croatia Chemica Acta, Vol 42, s. 457-466 (1970), Jugoslavia; European Journal of Biochemistry, Vol. 20, s. 558-560 (1971), Germany and Immunochemistry, Vol. 12, s. 349-351 (1975), U.K.). Imidlertid vil også slike modifiserte framgangsmåter ikke gi tilfredsstillende resultater med hensyn til nøyaktighet og reproduserbarhet og har ennå ikke blitt utnyttet i praksis.

Det er også foreslått at analyseringen utføres med lys av en nærmere angitt bølgelengde under anvendelse av bæreparkler med en nærmere angitt partikkeldiameter, slik som angitt i US patent nr. 4.118.192.

Imidlertid omfatter de kjente reagenser med høy sensitivitet for analyse av et antigen eller antistoff fine partikler sensibilisert med det passende antistoff eller antigen og slike partikler er beheftet med en felles ulempe at dispergerbarheten av de sensibiliserte partiklene kan bli så nedsett at de kan undergå ikke-spesifikk agglutineringsreaksjoner og at deres sensitivitet og immunoaktivitet kan variere

159964

2

meget under lagring hvilket fører til betydelig nedsettelse av påvisningsgrensen og nøyaktigheten.

- I henhold til oppfinnelsen er det funnet at for tilveie-
- 5 bringelse av sensibiliserte, partikkelformige reagenser for immunologiske reaksjoner, som er fri for de ovenfor nevnte ulemper, at mediet i hvilke de sensibiliserte partikler er dispergert er kritisk.
- 10 I henhold til oppfinnelsen er det tilveiebragt et sensibilisert, partikkelformet reagens for immunologiske reaksjoner som omfatter en partikkelformet bærer suspendert i et vandig medium med en elektrisk ledningsevne på 5,0 mS/cm eller mindre, idet den partikkelformige bærer er sensibilisert med
- 15 et antigen eller antistoff.

- Den pulverformige bærer som utgjør reagenset ifølge oppfinnelsen er vanligvis partikler som i det vesentlige er uoppløselige i vandige media. Slike partikkelformige bærere kan
- 20 være fremstilt av et hvilket som helst egnet materiale som innebefatter latexer av polymere materialer såsom polystyren, styren-butadienkopolymer, polyakrylat, polymetakrylat, akrylonitril-butadien-styrenkopolymerer, latexer av disse polymerer som er aktivisert ved innføring av karboksyl- eller
- 25 amidgrupper ved hjelp av kopolymerisering med akrylsyre, metakrylsyre, akrylamid eller lignende, blodceller, bakterier såsom stafylokokker og streptokokker, *Serratia marcescens* eller *rickettsia*, samt fragmenter av disse bakterier.
- 30 Den midlere partikkeldiameter for disse bærere er vanligvis 0,05-1,2 μm , fortrinnsvis 0,1-1,0 μm og mest foretrukket 0,2-0,8 μm . Hvis diameteren for den partikkelformede bærer er for stor vil området av analysen begrenses eller bli ustabil. På den annen side vil partikkelformede bærere med for
- 35 liten diameter føre til et stort økonomisk tap ved fremstilling av reagenset og det er ikke lett å oppnå en forbedret sensibilitet. Derfor er verken for stor eller for liten partikkeldiameter å foretrekke.

- Antigenene som skal bæres på den partikkelformige bærer i foreliggende reagens innebefatter eksempelvis proteiner, polypeptider, stereoider, polysakkarider, lipider, pollen, støv, haptener og lignende. Antistoffene innebefatter eksempelvis de proteiner som dannes som følge av reaksjonen ovenfor de nevnte antigener. Konsentrasjonen av den partikkelformede bærer er vanligvis 0,03-0,3%, fortrinnsvis 0,05-0,2% sluttlig konsentrasjon. Ved en høyere konsentrasjon av den partikkelformede bærer er det nødvendig å anvende et mer komplisert utstyr for analysen med foreliggende reagens uten at det oppnås noen ytterligere forbedring. På den annen side en lav konsentrasjon er heller ikke foretrukket for da oppnås det ikke tilfredsstillende sensibilitet og reaktivitet.
- 15 Den partikkelformede bærer kan sensibiliseres med et antigen eller antistoff på i og for seg kjent måte, eksempelvis ved fysisk adsorpsjon av antigenet eller antistoffet på den partikkelformige bærer, ved kjemisk binding mellom antigenet eller antistoffet og den partikkelformige bærer eller en kombinasjon av disse teknikker.

- Bæreren blir sensibilisert med antigenet eller antistoffet i en mengde som passende velges avhengig av forskjellige faktorer innebefattende type av det spesielle antigen eller antistoffet og den påtenkte nøyaktighet av analysen med reagenset.

- Den partikkelformede bærer sensibilisert med et antigen eller antistoff kan behandles med et stabiliseringsmiddel før det suspenderes i et vandig medium. Stabilisatorer som er nyttige for dette formål innebefatter aminosyrer, polypeptider, proteiner o.l. som ikke deltar i den påtenkte immunologiske reaksjon og serumalbumin er mest foretrukket som stabilisator. Behandlingen med stabilisatoren kan utføres på kjent måte og en slik behandling er fordelaktig ut fra lagringshensyn og stabil reaksjon. En spesielt betydelig effekt oppnås i det tilfellet hvor antigenet eller antistoffet er fysikalsk absorbert på bæreren.

Det vandige medium hvori bærere sensibilisert med antigenet

159964

4

5 eller antistoffet er suspendert og har en elektrisk lednings-
evne på 5,0 mS/cm eller mindre, fortrinnsvis 2,5 mS/cm eller
mindre og mest foretrukket 1,0 mS/cm eller mindre. En elek-
trinsk ledningsevne høyere enn 5,0 mS/cm gjør reagenset usta-
bilt, hvilket fører til nedsatt nøyaktighet av analysen.
Reagenset er særpreget ved det som er angitt i den karakteri-
serende del i krav 1 og 2.

10 Det vandige medium kan være vann, en pufferoppløsning eller
lignende og kan inneholde en eller flere additiver såsom
stabilisatorer, conserveringsmidler, geleringsmidler, over-
flateaktive midler etc. Pufferoppløsningen innebefatter
glysinpuffere, fosforsyrepuftere, sitronsyrepuffere, barbi-
talpuftere, boratpuftere, Tris[tris(hydroksymetyl)-amino-
metan]-saltsyrepuffere, Tris-maleatpuftere, ammoniakpuftere
15 og lignende.

Stabilisatorene innebefatter eksempelvis de ovenfor nevnte
og er vanligvis tilstede i en konsentrasjon på 0,001%-1,0%,
fortrinnsvis 0,05-0,6%.

20 Foretrukne eksempler på conserveringsmidler innebefatter
natriumazid og mertiolat.

Foretrukne eksempler på geleringsmidler innebefatter etylen-
diamintetraeddiksyre, nitrilotrieddiksyre, cykloheksandiamin-
tetraeddiksyre og lignende.

25 Som overflateaktivt middel er generelt ikke-ioniske overflate-
aktive midler foretrukket.

30 pH for det vandige medium er vanligvis 5-10, fortrinnsvis
6-9,5 og mest foretrukket 6,5-8,5. Hvis det vandige mediums
pH er lavere enn 5 vil reagenset bli ustabil selv om følsom-
heten økes. Et vandig medium med en pH verdi overstigende
10 er også uønsket fordi det fører til nedsatt følsomhet og
i visse tilfeller også nedsatt lagringsstabilitet.

35 Den partikkelformede bærer sensibilisert med antigenet eller
antistoffet blir vanligvis suspendert i det vandige medium
ved en konsentrasjon på 0,01-20%, fortrinnsvis 0,05-10%.

- Ved en lavere konsentrasjon vil det erholdte reagens ha ned-satt stabilitet og dets anvendelse blir uhensiktsmessig og begrenset, mens en høyere konsentrasjon vil også føre til ned-satt stabilitet og slike konsentrasjoner er uhensiktsmessige og derfor ikke foretrukket.

- Reagenset i henhold til oppfinnelsen kan fremstilles eksempelvis som beskrevet i de etterfølgende eksempler, eksempelvis ved sensibilisering av de partikkelformede bærere som beskrevet ovenfor med et antigen eller antistoff på i og for seg kjent måte og deretter om nødvendig behandle den sensibiliserte bærer med en stabilisator og suspendere bæreren i et vandig medium som ovenfor beskrevet på kjent måte.

- Reagenset i henhold til oppfinnelsen er egnet som reagens eller stamoppløsning derfor, eksempelvis for anvendelse ved en metode hvor man på et objektivglass eller i et prøverør foretar reaksjonen og visuelt observerer agglutineringen eller ved en fremgangsmåte hvor omsetningen skjer i en optisk celle og hvor reaksjonen måles optisk.

Reagenset kan anvendes for å analysere en immunologisk reaksjon som angitt i det etterfølgende.

- Om nødvendig blir reagenset i henhold til oppfinnelsen først fortynnet med en pufferoppløsning for å justere konsentrasjonen av bæreren sensibilisert med antigenet eller antistoffet slik at det er egnet for analyse av den immunologiske reaksjon. Egnede konsentrasjoner er avhengig av forskjellige faktorer innebefattende det spesielle antigen eller antistoff som skal analyseres, dets konsentrasjon og reaktivitet og kan bestemmes eksperimentelt. Generelt for tilfelle av optisk måling av den immunologiske reaksjon er det vanligvis foretrukket at sluttkonsentrasjonen av bæreren er minst 0,03 vekt-%, fortrinnsvis 0,05-1,0 vekt-% og mer foretrukket 0,1-0,5 vekt-%. For tilfellet av visuell observasjon av den immunologiske reaksjon er sluttkonsentrasjonen vanligvis i området 0,05-0,8 vekt-%, fortrinnsvis 0,1-0,5 vekt-%.

159964

6

Pufferoppløsningene som kan anvendes for å fortynne reagenset innebefatter glysinpuffere, boratpuffere, Trissaltsyrepuffere, Tris-malatpuffere, ammoniakkpuffere o.l.

5 pH for den anvendte pufferoppløsning ligger vanligvis i området 7,6-9,6, fortrinnsvis i området 8,0-9,0. En pufferoppløsning med lavere pH har en tendens til å forårsake agglutinerings hvilket gjør reagenset ustabil selv om det fører til forøket sensitivitet. Ved høyere pH avtar sensitiviteten og lagringsegenskapene ved forhøyet temperatur blir nedsatt.

Det således erholdte reagens kan anvendes for å måle en immunologisk reaksjon på konvensjonell måte.

15 Således i det tilfellet hvor den immunologiske reaksjon
observeres visuelt blandes en forhåndsbestemt mengde av rea-
genset med en antigen- eller antistoff-inneholdende prøve
på et objektivglass eller i et prøverør og agglutinerings-
20 de sensibiliserte partikler observeres.

I det tilfellet hvor den immunologiske reaksjonen måles optisk blir en forhåndsbestemt mengde av reagenset og en antigen- eller antistoff-inneholdende prøve blandet og for-
25 andring i lystransmisjon, lysspredning eller turbiditet bestemmes i en optisk celle.

Når den optiske måling utføres ved bestemmelse av lystransmisjon er lysets bølgelengde vanligvis større enn den midlere partikkeldiameter for bæreren med en faktor på minst 1,1 fortrinnsvis 1,5 og mer foretrukket minst 2. Bølgelengden vil vanligvis ligge i området 600-2400 nm, fortrinnsvis 800-1800 nm. Hvis lyset har en kortere bølgelengde er det nødvendig for å oppnå en passende lystransmisjon å anvende en partikkelformet bærer med tilstrekkelig lav konsentrasjon sammen med et reagens som har en ekstremt god dispergerbarhet og det er derfor vanskelig å fremme sensiteten og i visse tilfeller vil en reversering av reaksjonen finne sted. En lengre bølgelengde er også uønsket p.g.a.

nedsatt følsomhet. Det anvendte lys kan enten være monokromatisk eller polykromatisk.

5 De optiske celler som anvendes ved måling av lystransmisjon har vanligvis en tykkelse på 0,2-10 mm.

10 Transmisjonsmålingene kan utføres ved å bestemme tiden som medgår for å nå en forhåndsbestemt absorpsjonsverdi eller ved å bestemme forøkningen i absorpsjon over et forhåndsbestemt tidsrom.

Ved optisk måling under anvendelse av lysspredning kan denne utføres på samme måte som ved bestemmelse av lystransmisjon.

15 Reagensene i henhold til oppfinnelsen er sensibiliserte partikkelreagenser for anvendelse ved immunologiske reaksjoner med hvilke man kan bestemme mengdene av et antigen eller
20 antistoff i forskjellige prøver med god reproducerbarhet og høy nøyaktighet. I tillegg er de effektive etter å ha vært nedfrosset og smeltet på ny og de kan derfor lyofiliseres og anvendes på ny.

Oppfinnelsen skal beskrives ved hjelp av de etterfølgende eksempler.

25

30

35

159964

8

Eksempel 1

- Antistoffglobulin mot α -fetoprotein ble oppløst i 0,1 M glysinpuffer (pH 8,8). Antallet av antistoffglobuliner var ekvivalent med 800-1500 for hver latexpartikkel (med en
- 5 diameter på 0,220 μ m, fremstilt av Dow Chemical). Oppløsningen ble deretter blandet med et likt volum latex-glycinpuffer (pH 8,8) ved romtemperatur under omrøring for å sikre en tilstrekkelig sensibilisering. Etter sentrifugeseparasjon ble den ovenfor flytende væske fjernet og utfelningen ble
- 10 behandlet med en passende mengde storfeserumalbumin. De således erholdte sensibiliserte partikler ble suspendert i pufferoppløsningen med en elektrisk ledningsevne på 1,5 mS/cm og inneholdende en passende mengde av et conserveringsmiddel og suspensjonen ble lagret. Det erholdte reagens
- 15 utviste ekstremt god nøyaktighet ved analyse.

Reagenset ble fortynnet og anvendt ved analyse av en immunologisk reaksjon.

- 20 Fortynningen ble utført med en glysinpuffer (pH 8,6). Resultatene av analysen med hensyn til presisjonen innen en prøveserie og med hensyn til presisjon fra dag til dag er vist i henholdsvis tabellene 1 og 2.

25

30

35

159964

9

Tabell 1 Presisjon innen en prøveserie

5

10

15

20

25

Nr.	Serumprøve ng/ml		
	1 (45,0) *	2 (195,6) *	3 (950,0) *
1	45,2	189,2	906,2
2	41,3	190,5	917,5
3	42,0	195,8	887,5
4	44,5	181,1	901,3
5	44,6	190,5	906,3
6	43,6	189,7	937,1
7	42,5	190,1	885,0
8	42,0	184,5	918,0
9	38,9	180,5	913,5
10	38,6	184,2	925,3
11	40,2	185,6	921,0
12	39,7	190,1	887,2
Gjennomsnitt	41,9	187,7	908,8
Standardavvik	2,26	4,49	16,4
Variasjons- koeffisient	5,4%	2,4%	1,8%

*Verdiene i parentes er de bestemt ved radioimmunoanalyse.

30

35

159964

10

Tabell 2 Dag-til-dag presisjon

5	Nr.	Måned/Dag (1980)	Serumprøve ng/ml		
			1	2	3
10	1	2/4	55,3	153,0	530,6
	2	2/7	49,2	145,8	517,6
	3	3/5	54,3	154,1	542,9
	4	3/27	45,5	149,0	464,3
	5	4/10	47,5	146,0	483,3
15	6	5/7	48,5	151,0	500,8
	7	5/14	47,8	148,3	478,3
	8	5/21	51,8	138,2	507,3
	9	6/10	50,3	159,7	512,8
	10	6/25	52,1	156,3	521,3
20	Gjennomsnitt		50,2	150,1	505,9
	Standardavvik		3,13	6,12	24,5
	Variasjons- koeffisient (%)		6,2	4,1	4,9

25

30

35

Eksempel 2

Anti-CRP (C-reaktivt protein) antistoff ble oppløst i 0,2 M boratpuffer (pH 8,8) og latexpartikler (diameter 0,220 μ m fremstilt av Dow Chemical) ble suspendert i den samme puffer og sensibilisert med den erholdte oppløsning slik at hver partikkel bar 800-1800 antigener. De sensibiliserte latexpartikler ble behandlet med storfeserumalbumin og dispergert i en passende mengde boratpuffer (4,0 mS/cm). Det resulterende reagens utviste ved måling ekstremt god nøyaktighet.

Eksempel 3

Kanin eller geit antihuman fibrinogen antistoff $F(ab')_2$ ble oppløst i 0,1 M Tris-malatpuffer (pH 8,6) og latexpartikler (diameter 0,220 μ m, fremstilt av Dow Chemical) ble suspendert i den samme puffer og således sensibilisert med den resulterende oppløsning slik at sensitiviteten for det resulterende reagens var av størrelsesorden 100 ng/ml. Partiklene ble behandlet med storfeserumalbumin og suspendert i en vandig oppløsning inneholdende 0,1% natriumacid (1,0 mS/cm). Ved anvendelse ble reagentet fortynnet med Tris-malatpuffer (pH 8,4) eller Tris-saltsyrepuffer (pH 8,4) til en ønsket latexkonsentrasjon og omsatt på et objektivglass eller kan tjene som reagens for optisk analyse uten ytterligere fortynning. Ved en reaksjon på et objektivglass under anvendelse av dette reagens kan man lett skjelne mellom agglutineringsmønstre og ikke-agglutineringsmønstre.

Eksempel 4

Geit-antistoffglobulin mot human IgG ble oppløst i en 0,1 M Tris-malatpuffer (pH 8,8) og latexpartikler (0,312 μ m fremstilt av Dow Chemical) suspendert i den samme puffer og sensibilisert med oppløsningen. De sensibiliserte partikler ble behandlet med storkvegserumalbumin og til slutt suspendert i en vandig oppløsning med en ledningsevne på ca. 3,0 mS/cm. Ved anvendelse ble suspensjonen fortynnet med 0,1 M Tris-malat eller Tris-HCl puffer til ønsket konsentrasjon eller anvendt som det var.

159964

12

Eksempel 5

- Kanin anti-human IgA antistoff $F(ab')_2$ ble oppløst i en 0,2 M boratpuffer (pH 8,3) og oppløsningen behandlet på samme måte som beskrevet i eksempel 4 til å gi det ønskede reagens
- 5 i en suspensjon, bortsett fra at den vandige oppløsning som ble anvendt for de endelige suspenderte og sensibiliserte partikler hadde en ledningsevne på 0,5-0,8 mS/cm.

Eksempel 6

- 10 Latexpartikler ble sensibilisert med høyrenset kanin anti-human IgM antistoff i en glysinpuffer med pH 9,6. Det kvantitative forhold varierte avhengig av kvaliteten av antistoffet og den ønskede sensibilitet. Etter at de sensibiliserte partikler var behandlet med en passende mengde stor-
- 15 feseserumalbumin ble de suspendert i en vandig oppløsning med en ledningsevne på ca. 1,2 mS/cm (som kan inneholde ca. 0,05 vekt-% storfeseserumalbumin) til å gi det ønskede reagens.

Eksempel 7

- 20 Høyrenset kanin anti-hCG antistoff $F(ab')_2$ ble oppløst i en 0,2 M Tris-HCl puffer (pH 8,6) og den resulterende oppløsning anvendt for å sensibilisere latexpartikler (diameter 0,220 μm , fremstilt av Dow Chemical) suspendert i den samme puffer ved romtemperatur. Etter behandling med en passende
- 25 mengde storfeseserumalbumin ble de sensibiliserte partikler suspendert i en vandig oppløsning med en ledningsevne på 0,8 mS/cm og lagret.

30

35

P a t e n t k r a v

1. Et sensibilisert, partikkelformig reagens for immuno-
logiske reaksjoner omfattende en partikkelformig bærer med
5 en midlere partikkeldiameter på 0,05 - 1,2 μm og som er
sensibilisert med et antigen eller antistoff,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det vandige medium
for partikkelsuspensjonen har en elektrisk ledningsevne på
10 5,0 mS/cm eller mindre.

2. Reagens ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det vandige medium
for partikkelsuspensjonen har en elektrisk ledningsevne på
15 2,5 mS/cm eller mindre.

20

25

30

35