



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTEGNINGSSKRIFT Nr. 149864

**[C] (45) PATENT MEDDELT
4. JULI 1984**

(51) Int. Cl.³ G 01 N 33/54, C 08 L 71/00

(21) Patentsøknad nr. 760203
(22) Inngitt 22.01.76
(24) Løpedag 22.01.76

(41) Alment tilgjengelig fra 30.07.76
(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 26.03.84
(30) Prioritet begjært 29.01.75, 06.03.75, 19.09.75, USA, nr. 545066,
555908, 615024

(54) Oppfinnelsens benevnelse Immunologisk reagens.

(71)(73) Søker/Patenthaver COOPER LABORATORIES INC.,
3145 Porter Drive,
Palo Alto, CA,
USA.

(72) Oppfinner CARLTON DEATON,
Garden Grove, CA,
USA.

(74) Fullmektig Cand.mag. Johan H. Gørbitz,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

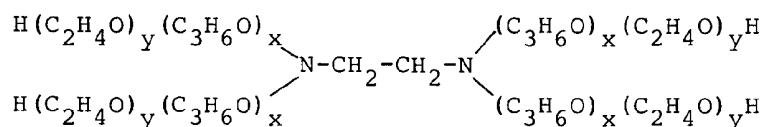
(56) Anførte publikasjoner BRD (DE) off.skrift nr. 1598151
USA (US) patent nr. 3770631, 3816262
Litt.: Hellsing, K., "Protids of Biological
Fluids", Vol. 21, s. 579-583 (1974)
Lundkvist, U., et al., Immunology, Vol. 23,
s. 413-422, (1972)

Denne oppfinnelse angår generelt et immunologisk reagens som er i stand til å forsterke en immunologisk felningsreaksjon. Mer spesielt angår oppfinnelsen en immunologisk reagensoppløsning som kan anvendes ved en rekke forskjellige immunologiske måle-metoder.

Det eksisterer tallrike immunologiske målemetoder med sterkt varierende metodikk, som gjør det nødvendig på et eller annet trinn ved målingen og for varierende formål, å gjøre så mye som mulig av antigen-antistoff-komplekset uoppløselig. Uoppløseliggjørelse av kompleksene spiller f.eks. en viktig rolle ved slike illustrerende, viktige vanlige immunologiske målemetoder som elektroforetisk analyse, enzymatisk måling, radioimmunologisk måling (RIA) og nefelometriske målinger, og mye arbeid har vært rettet mot utvikling av midler for å øke uoppløseligheten av kompleksene for å forbedre disse målinger. Normalt er uoppløseliggjørelse av kompleksene nødvendig for å isolere det immunologiske reaksjonsprodukt fra de uomsatte immunologiske reagenser som er med ved en spesiell måling, slik at enten det isolerte reaksjonsprodukt eller de uomsatte reagenser kan analyseres separat for å gi en meningsfylt diagnostisk måling.

For en immunologisk målemetode som f.eks. omfatter en nefelometrisk analyse, er det kjent å fortynne måleprøver med en oppløsning av polyetylenglykol-polymer før både inkubering av prøven og avlesning på det nefelometriske instrument. Selv om polyetylenglykol forbedrer den nefelometriske analyse ved å øke konsentrasjonen av suspenderte partikler, og derved forbedre analysen, står man imidlertid tilbake med det problem at tilfredsstillende analyse av mange biologiske komponenter ikke kan foretas på grunn av utilstrekkelig prøveområde eller følsomhet på grunn av utilstrekkelig konsentrasjon av suspenderte partikler i måleprøven. Det generelle formål med foreliggende oppfinnelse er å løse det ovennevnte problem ved å tilveiebringe et forbedret immunologisk reagens som er effektivt til i vesentlig grad å øke uoppløseliggjørelsen av antistoff-antigen-komplekser utover det som kan oppnås med polyetylenglykol alene, og derved øke konsentrasjonen av suspenderte partikler i måleprøven, for å tillate analyse av biologiske bestanddeler som ikke er mulig med polyetylenglykol alene, uavhengig av om nefelometriske eller andre måle-metoder anvendes.

- a) en blokk-kopolymer av etylenoksyd og polyoksypropylen,
- b) lineære, primære, alifatiske oksyalkylerte alkoholer,
- c) glycerol-monostearat,
- d) polyoler med formelen



e) alkylarylsulfonater.

Man får således også en immunologisk målemetode som omfatter omsetning mellem et antistoff og et antigen for å danne et antistoff-antigen-kompleks, ved at det anvendes et reagens

ifølge oppfinnelsen for i vesentlig utstrekning å øke graden av uoppløseliggjørelse av antigen-antistoff-komplekset som dannes ved reaksjonen.

Reagenset kan hensiktsmessig innføres i prøvemediet for utførelse av en nefelometrisk, enzymatisk, elektroforetisk eller radioimmunologisk målning.

Når det f.eks. utføres en nefelometrisk målemetode for analyse av biologiske bestanddeler i form av antistoff-antigen-komplekser, inkuberes først reagenset og suspenderte partikler av de biologiske bestanddeler, hvorefter den nefelometriske analyse foretaes. I henhold til denne metode bringes en lyskilde til å passere gjennom en flytende måleprøve, hvorved lysstrålene rettes gjennom de suspenderte partikler. Når disse lysstrålene treffer partiklene, spres eller diffunderes de med en hvilken som helst forhåndsbestemt vinkel, f.eks. en rett vinkel, fra kilden og oppfanges av fotoceller. Dette spredte lys omdannes til et elektrisk signal som er direkte proporsjonal med

partikkelkonsentrasjonen som derved måles nøyaktig på en skala på et instrument.

Eksempler på instrumenter som er egnet for nefelometriske analyser, er Hyland Laser Nephelometer PDQ (Hyland Laboratories); Aminco-Fluorocolorimeter (American Instrument Company); Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer (SPF); og Auto Analyser II med tilkoblet Fluoronephelometer (Technicon Instruments Corporation).

Ved hjelp av disse nefelometriske prinsipper og utstyr kan den kliniske teknikker foreta en nøyaktig bestemmelse av små konsentrasjoner av en rekke forskjellige spesifikke proteiner, f.eks. immunoglobulinene IgG, IgA, IgM, transferrin, komplement C3, haptoglobin, α_1 -antitrypsin, β -lipoprotein, albumin, α_2 -makroglobulin, α_1 -syre glykoprotein, og forskjellige andre biologiske bestanddeler så som triglycider, lipoproteiner og menneskelige chorione gonadotropiner.

De viktigste fordeler som oppnåes ved anvendelse av reagenser i henhold til oppfinnelsen er at (a) inkuberingstidene reduseres betydelig og (b) høyere konsentrasjon av uoppløseliggjorte kompleks-partikler oppnåes ved kortere inkubasjonstid med resulterende forbedret prøveområde og følsomhet. Disse fordeler gjelder for enhver immunologisk prøvemethode som begünstiges ved øket uoppløseliggjørelse av antigen-antistoff-

komplekset på et eller annet punkt av målningen. Fordelene gjelder også for immunologiske prøvemeter som er avhengig av et antigen-antistoff-kompleks uoppløseliggjørelsestrinn på et eller annet punkt under måleprosessen.

I tillegg til å inneholde, ved bruk, 3 til 6 vekt% av blandingen av polyetylenglykol og det ikke-ioniske overflateaktive middel, skal den vandige reagens oppløsning, som angitt ovenfor, også ha en beregnet HLB-verdi mellom 0,7 og 1,7.

HLB-verdien er et veletablert mål for den hydrofile-lipofile balanse (derfor "HLB") for et gitt overflateaktivt middel. HLB-systemet for identifikasjon av overflateaktive midler ble utviklet av Atlas Chemical Industries, Inc., og er beskrevet i detalj på sidene 28-36 i Atlas-publikasjonen med tittel "Guide to the Use of Atlas Surfactants and Sorbitol in Cosmetic and Pharmaceutical Products" (1965). Hvert overflateaktive middel er gitt en HLB-verdi. Jo lavere HLB-verdien er, desto mer lipofilt (eller oljetiltrekkende) er det overflateaktive middel, mens jo høyere verdien er, desto mer hydrofilt (eller vanntiltrekkende) er det overflateaktive middel. Metoden for fastleggelse av HLB-verdien for et hvilket som helst overflateaktivt middel er velkjent og beskrevet f.eks. i en alminnelig tilgjengelig publikasjon fra Atlas med tittelen "The Atlas HLB System" (Code LD-97). HLB-verdiene for tallrike overflateaktive midler er også publisert i stor utstrekning i litteraturen, særlig litteratur utgitt av fabrikanten av vedkommende overflateaktive middel.

HLB-verdien for en blanding av overflateaktive midler, slik som det er i reagenset ifølge oppfinnelsen, er en funksjon av konsentrasjonen av hvert overflateaktivt middel i blandingen, og således må konsentrasjonen av de enkelte overflateaktive midler tas i betraktning ved beregning av en HLB-verdi for blandingen. HLB-verdien for blandingen beregnes, i overensstemmelse med godtatte publiserte metoder, ved å multiplisere den angitte HLB-verdi for hvert overflateaktivt middel tilstede i blandingen, med dets konsentrasjon i vedkommende preparat, og addering av de individuelle beregnede resultater. Hvis f.eks. reagenset ifølge oppfinnelsen inneholdt 1 vekt% polyetylenglykol (HLB = 20) og 3 vekt% av et ikke-ionisk overflateaktivt

149864

middel med en HLB på 30,5, ville HLB-verdien for reagenset bli beregnet som følger:

$$0,01 \times 20 = 0,2$$

$$0,03 \times 30,5 = + 0,915$$

1,115 -- HLB-verdien for reagenset

For å bestemme hvorvidt et gitt reagens har en HLB-verdi som faller innenfor området 0,7 til 1,7 ifølge oppfinnelsen, kan man lett foreta en beregning som beskrevet ovenfor, basert på mengden av hver komponent i blandingen, under anvendelse av enten publiserte HLB-verdier for de aktuelle komponenter eller HLB-verdier som er bestemt i henhold til Atlas-metoden.

Foreliggende oppfinnelse går ut på anvendelse av en rekke forskjellige ikke-ioniske overflateaktive midler sammen med polyetylenglykol, forutsatt at (1) blandingen av ikke-ionisk overflateaktivt middel og polyetylenglykol faller innen et område fra 3 til 6 vekt% på det tidspunkt reagenset anvendes ved målningen, og (2) at den beregnede HLB-verdi for reagenset samtidig faller innenfor et område fra 0,7 til 1,7. Hvis blandingen av polyetylenglykol og ikke-ionisk overflateaktivt middel ved brukstidspunktet utgjør mindre enn 3% av reagenset, eller hvis reagenset har en HLB lavere enn 0,7, blir det vanskelig å uoppløseliggjøre den ønskede mengde av antigen-antistoff-kompleks i den utstrekning som er nødvendig for en vellykket gjennomførelse av den immunologiske målning. Hvis på den annen side blandingen utgjør mer enn 6% av reagenset, eller hvis reagenset har en HLB høyere enn 1,7, vil andre proteiner i tillegg til det ønskede antigen-antistoff-kompleks gjøres uoppløselige, og derved ødelegges målningens selektivitet, og resultatene blir meningsløse.

Reagensoppløsningen kan selvsagt av forskjellige grunner fremstilles og bringes på markedet på en slik måte at det ikke inneholder den fastsatte 3 til 6% blanding av polyetylenglykol og ikke-ionisk overflateaktivt middel, eller ikke har den fastsatte HLB-verdi på 0,7 til 1,7. Dårlig hylle-stabilitet kan være en slik grunn. Som angitt ovenfor, vil imidlertid slike oppløsninger kreve regulering før eller på et eller annet tidspunkt under bruken ved en immunologisk målning, til 3 til 6% området og til en HLB-verdi fra 0,7 til 1,7. Reagenser som

149864

ikke inneholder de fastsatte 3 til 6% av nevnte blanding eller ikke har en HLB-verdi fra 0,7 til 1,7, men som lett kan reguleres til disse verdier før eller under den immunologiske prøvning, faller av denne grunn inn under oppfinnelsen, selv om de opprinnelig kan være utenfor de spesielle konsentrasjonsparametre og HLB-området som er nødvendig under selve målningsprosessen:

Den markedsførte reagensoppløsning kan f.eks. kreve, hvis de spesielle parametre for konsentrasjon og HLB-verdier faller utenfor henholdsvis områdene fra 3 til 6% og 0,7 til 1,7, fortynning, konsentrering eller andre reguleringstrinn før eller på et eller annet hensiktsmessig tidspunkt under utførelse av målningen, for å bringe oppløsningen til å inneholde en mengde av blandingen på 3 til 6% og en beregnet HLB-verdi fra 0,7 til 1,7. I slike tilfeller vil den markedsførte oppløsning fortsatt falle inn under foreliggende oppfinnelse. Således kan reagenset markedsføres med en blandingskonsentrasjon høyere en 6%, f.eks. 8%, og ville da fortynnes enten før eller ved et eller annet egnet tidspunkt under en immunologisk prøvning, til området fra 3 til 6%. Tilsvarende kan reagenset markedsføres med en beregnet HLB-verdi utenfor området 0,7 til 1,7, men med det krav at reagensoppløsningen reguleres før eller ved et eller annet egnet tidspunkt under en immunologisk prøve for å bringe den til en beregnet HLB-verdi i området fra 0,7 til 1,7.

Reagenset kan i visse tilfeller fortynnes til de ønskede verdier med det antiserum som skal anvendes ved prøven, mens i andre tilfeller kan det fortynnes med måleprøven eller i noen tilfeller med både måleprøven og antiserum. Det viktige er at på et eller annet tidspunkt under den immunologiske prøvning, vanligvis enten før eller samtidig med antigen-antistoff-reaksjonen, må den nødvendige mengde på 3 til 6% av samlet polyetylenglykol og ikke-ionisk overflateaktivt middel, og den nødvendige HLB-verdi på 0,7 til 1,7, tilveiebringes for at reagenset ifølge oppfinnelsen skal virke skikkelig ved målningen. Det tidspunkt under måleprosessen hvor disse nødvendige parametre må tilveiebringes, kan variere avhengig av den spesielle metode som anvendes. For en nefelometrisk analyse er det f.eks. hensiktsmessig å fremstille og markedsføre reagenset ifølge oppfinnelsen med en konsentrasjon av polyetylenglykol og ikke-ionisk overflateaktivt middel på over 6% og med en HLB-verdi

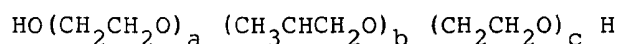
utenfor området 0,7 til 1,7. Umiddelbart før bruk ved den nefelometriske analyse fortynnes så reagenset med det anti-serum som skal anvendes ved analysen, for å tilveiebringe en konsentrasjon av polyetylenglykol og ikke-ionisk overflateaktivt middel mellom 3 og 6%, fortrinnsvis ca. 4%, og en beregnet HLB-verdi i området 0,7 til 1,7.

De relative mengdeforhold av polyetylenglykol og ikke-ionisk overflateaktivt middel i blandingen kan variere innenfor vide grenser, avhengig hovedsakelig av det anvendte overflateaktive middel. Blandingen inneholder fra 10 til 90 vekt% polyetylenglykol og 10 til 90% ikke-ionisk overflateaktivt middel. Fortrinnsvis inneholder blandingen 15-85% polyetylenglykol og 15 til 85% ikke-ionisk overflateaktivt middel.

En eller flere forskjellige former eller typer av polyetylenglykol kan anvendes som polyetylenglykol-komponenten i blandingen. Den anvendte polyetylenglykol-polymer har vanligvis en molekylvekt fra 200 til 10.000, og fortrinnsvis fra 4.000 til 6.000. Disse materialer er kommersielt tilgjengelige, f.eks. "Carbowax" 4000 eller 6000 og PEG 4000 eller 6000. Et molekylvekt-område på ca. 4000 er særlig foretrukket.

Den ikke-ioniske overflateaktive komponent i blandingen er et ikke-ionisk overflateaktivt middel som i reagensoppløsningen vil gi en beregnet HLB-verdi på 0,7 til 1,7, og fortrinnsvis 0,7 til 1,3, ved en konsentrasjon av blandingen på 3 til 6%. Som en illustrasjon kan HLB-verdiene for det ikke-ioniske overflateaktive middel selv være fra 10 til 30 eller mer.

Et særlig foretrukket ikke-ionisk overflateaktivt middel er en blokk-kopolymer av etylenoksyd og polyoksypropylen. Denne særlige polymer og fremstillingen derav er beskrevet i US-patent 2.674.619. Disse blokk-kopolymerer fremstilles generelt ved kondensering av etylenoksyd med polyoksypropylen-polymer og kan representeres ved den følgende strukturformel:



For oppfinnelsens formål inneholder disse blokk-kopolymerer hensiktsmessig minst 50% etylenoksyd i molekylet og en polyoksyprop-

149864

ylene hydrofob grunnstamme med molekylvekt på minst 950, slik som beskrevet i U.S. patent 3.450.502, 3.577.522 og 3.590.125.

Illustrerende eksempler på slike egnede blokk-kopolymerer er F-38 og F-68 "PLURONIC" polyoler.

F-38 inneholder 80% polyoksyetylen hydrofile enheter i molekylet, og den hydrofobe polyoksypropylen-grunnstamme har en molekylvekt på 950. F-38 er et særlig foretrukket ikke-ionisk overflateaktivt middel. F-68 inneholder også 80% polyoksyetylen hydrofile enheter i molekylet, men den hydrofobe grunnstamme har en molekylvekt på 1.750. Den totale molekylvekt for disse to "PLURONIC" polyoler er henholdsvis 4.750 og 8.750. "PLURONIC" L-125 er også funnet egnet. En ytterligere beskrivelse av disse polyoler finnes i publikasjonen fra Wyandotte Chemicals Corporation, "The Pluronic Grid" sjette utgave.

Når det gjelder "PLURONIC" ikke-ioniske overflateaktive midler, foretrekkes generelt en blanding bestående av 20 til 40 vekt% polyetylenglykol og 80 til 60% blokk-kopolymer av etylenoksyd og polyoksypropylen-polymer.

En meget foretrukket reagensoppløsning inneholder ca. en vektdel polyetylenglykol med en molekylvekt på ca. 4000 og ca. tre vektdeler av "PLURONIC" F-38 materialet. Denne oppløsning kan fremstilles i et salt oppløsningsmiddel (f.eks. 0,9% NaCl) enten ved, over eller under den ønskede mengde på 3 til 6%, og reguleres derefter, hvis nødvendig, til den ønskede mengde på 3 til 6%. Fortrinnsvis fremstilles oppløsningen som en 8% oppløsning av polymerblandingen i saltvann, som derefter fortynnes med antiserum (se eksemplene 1 og 5) eller et annet egnet fortynningsmiddel før bruk ved en immunologisk prøvning. Det fortynnete reagens inneholder således ca. 1% polyetylenglykol og 3% F-38. Dets HLB-verdi på 1,115 kan beregnes som følger:

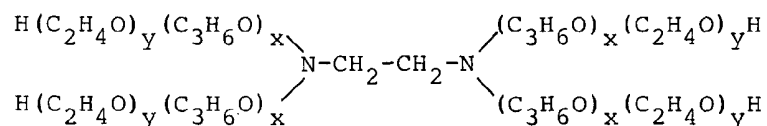
$$\begin{array}{lll} 1\% \text{ PEG:} & 0.01 \times 20^{\times} & = 0.2 \\ 3\% \text{ F-38:} & 0.03 \times 30.5^{\times\times} & = \underline{0.915} \\ & & 1.115 \end{array}$$

[×] HLB for PEG fra litteraturen er 20

^{xx} HLB for F-38 fra litteraturen er 30,5

De andre ikke-ioniske overflateaktive midler som kan anvendes sammen med polyetylenglykolen i reagensoppløs-

ningen ifølge oppfinnelsen, tilveiebringer også den ønskede HLB-verdi på 0,7 til 1,7 ved en konsentrasjon av blandingen på 3 til 6%. F.eks. er "Tetronic"-serien av ikke-ioniske overflateaktive midler, som er beskrevet i detalj i BASF Wyandotte brosjyren med tittelen "Technical Data on Tetronic^R Series Nonionic Surfactants" og i US-patent 2.979.528, funnet å være ganske egnet, særlig de som er identifisert som "Tetronic" 707, 908, 1107, 1307 og 1508. "Tetronic"-produktene er basert på etylendiamin og har den generelle formel:



Molekylvektområdet for "Tetronic"-produktene kan variere fra ca. 1.650 til over 26.000. De særlig foretrukne "Tetronic" overflateaktive midler har molekylvekter i området fra 15.000 til 27.000 og HLB-verdier fra 20 til 30,5. Mengdeforholdet av polyetylenglykol til "Tetronic" overflateaktivt middel i blandingen kan variere i stor utstrekning som nevnt ovenfor.

En annen gruppe egnede ikke-ioniske overflateaktive midler er "Plurafac"-produktene, særlig de som er identifisert som "Plurafac" 17R8, 25R8, D25, A38 og A39. "Plurafac"-produktene er lineære, primære, alifatiske, oksyalkylerte alkoholer som er beskrevet mer detaljert i BASF Wyandotte brosjyren med tittelen "Technical Data on Typical Physical Properties of Plurafac^R Nonionic Surfactants". De foretrukne "Plurafac"-produkter har HLB-verdier fra 10 til 20 og kan varieres i meget varierende forhold sammen med polyetylenglykol.

Andre egnede ikke-ioniske overflateaktive midler omfatter glycerol-monostearat og gruppen alkylarylsulfonater. Et foretrukket glycerol-monostearat er tilgjengelig under navnet "Arlacel" 165 (HLB = 11,0), mens et typisk egnet alkylaryl-sulfonat også er tilgjengelig under handelsnavnet "G-3300" (HLB = 11,7). Alle disse overflateaktive midler tilveiebringer et reagens som ved anvendelse ved en immunologisk prøvemethode med et innhold på 3

149864

til 6% av en blanding av polyetylenglykol og overflateaktivt middel, har en beregnet HLB-verdi basert på verdiene for de enkelte komponenter tilstede i oppløsningen på 0,7 til 1,7, og gir den virkning at uoppløseligheten av det ønskede antigen-antistoff-kompleks økes i den utstrekning som er nødvendig for å forbedre prøvemethoden, og uten å gjøre uønskede komponenter uoppløselige eller på annen måte påvirke måleprosessen i uheldig retning.

Selvsagt kan mer enn ett ikke-ionisk overflateaktivt middel være tilstede sammen med polyetylenglykolen, forutsatt at den fastsatte konsentrasjon av blandingen og oppløsningens HLB-verdi oppnåes.

Ved valg av et ikke-ionisk overflateaktivt middel til bruk ifølge oppfinnelsen, bør man anvende et som også har evnen til å gi en klar reagensoppløsning, i det minste når reagensoppløsningen først anvendes ved den immunologiske prøvning. Dette er for å sikre at reagenset ikke innvirker på prøveresultatene eller frembringer ikke-spesifikk felning av komponenter av den biologiske prøve eller biologiske reagenser som anvendes i målesystemet.

Reagenssystemet ifølge oppfinnelsen kan anvendes i utstrakt grad ved forbedring av vanlige immunologiske prøvemethoder som på et eller annet tidspunkt, av en eller annen grunn, krever uoppløseliggjørelse av antigen-antistoff-komplekset som dannes under prøveprosessen ved antigen-antistoff-reaksjonen. Slike målemethoder er velkjente for fagfolk og skal her ikke beskrives i detalj. Anvendbarheten og nytten av foreliggende oppfinnelse ved disse forskjellige målemethoder, og detaljer vedrørende hvordan reagenset ifølge oppfinnelsen skal anvendes ved slike metoder, vil være åpenbare for fagfolk på grunnlag av denne beskrivelse og skal derfor ikke gjentaes i noen utstrekning her. F.eks. kan reagenset ifølge oppfinnelsen anvendes for å forbedre ethvert system som er avhengig av utfelning av antigen-antistoff-komplekser for å gi en klar væske på toppen, for fluorescens eller kolorimetrisk påvisning. Reagenset bør også kunne anvendes for å fjerne innvirkende stoffer som finnes i biologiske væsker eller reagenser

(f.eks. lipider, salter og fremmede proteiner) for nefelometri, enzymatiske eller andre målesystemer. Dette oppnåes ved å fjerne reagensene fra reaksjonsoppløsningen for å vaske og suspendere disse reagenser på nytt.

Spesielt kan reagenset ifølge oppfinnelsen anvendes for å øke den relative konsentrasjon av uoppløselige antigen-antistoff-komplekser og øke et gitt målesystems prøveområde og følsomhet. Disse prinsipper kan anvendes på kvantitativ lysspredning fra immun-komplekser ved nefelometri, og dette er for tiden en foretrukket utførelsesform for oppfinnelsen. Nefelometriske analyser hvor man anvender reagenset ifølge oppfinnelsen, er særlig nyttige ved analyse av forskjellige immunoglobuliner. Imidlertid kan andre prøvesystemer som er basert på utfelning av antistoffer, utnytte disse reagenser, så som radioimmunodiffusjon (RID), enzymatiske analyser og forskjellige typer av elektroforetiske teknikker så som immunoelektroforese (IEP), motelektroforese (CEP) og elektroimmunodiffusjon (EID).

Reagenset ifølge oppfinnelsen kan f.eks. anvendes for å forbedre immunologiske prøvninger som er avhengig av den primære innvirkning av antigen-antistoff-samutfellingsteknikk som vanligvis anvendes ved radioimmunomålinger (RIA). Denne forbedrede uoppløselighet som oppnåes ifølge oppfinnelsen, kan også utnyttes for forskjellige metoder for å binde antistoffer eller antigen til inerte partikler som anvendes som bærer ved RIA, nefelometrisk og fluorometrisk måling på en måte som lett vil forstås av fagfolk.

Tallrike radioimmunomålinger er anvendt for å bestemme kvantitativt relativt små konsentrasjoner av biologiske bestanddeler som finnes i kroppsvæsker. Isotop-merket antigen eller antistoff bringes til å reagere med det homologe antigen eller antiserum for å danne merkede immun-antigen-antistoff-komplekser. Disse komplekser må derefter normalt gjøres uoppløselige ved hjelp av en uoppløselig bærer, felningsreagens eller på annen kjent metode. Det frie eller ureagerte, merkede antigen eller antistoff kan fjernes ved forskjellige vaskemetoder. Den radioaktive konsentrasjon av de utfelte komplekser bestemmes derefter ved gamma- eller væske-scintillasjons telling. Et eksempel på et instrument som anvendes for målinger av denne type, er Auto Gamma Counter. Reagenset i henhold til oppfinnelsen er nyttig til å forsterke den nødvendige uoppløselig-

149864

gjørelse av kompleksset, slik at analysen forbedres. Det følgende eksempel 6 illustrerer anvendelse av reagenset ifølge oppfinnelsen ved en radioimmunomåling.

Enzymatiske teknikker er også anvendt for å bestemme kvantitativt små konsentrasjoner av biologiske bestanddeler som finnes i kroppsvæsker. Enzym-merket antigen eller antistoff bringes til å reagere med det spesifikke antistoff eller antigen for å danne immune merkede antigen-antistoff-komplekser. Disse komplekser gjøres uoppløselige ved hjelp av en uoppløselig bærer, et felningsmiddel eller på annet måte. Det frie eller ureagerte enzym-merkede antistoff eller antigen kan fjernes ved forskjellige vaskemetoder. Det bundne eller reagerte enzym kan derefter frembringe en reaksjon med et passende substrat for å danne en farvet eller fluorescerende oppløsning på toppen, som kan måles med et spektrofotometer eller fluorometer. Eksempler på instrumenter som er nyttige for dette formål, er Beckman DB Spectrophotometer (tilgjengelig fra Beckman Instruments, Inc.) og Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer (tilgjengelig fra American Instrument Company). Reagenset ifølge oppfinnelsen er også nyttig til å forbedre det nødvendige trinn med uoppløseliggjørelse av kompleksset slik at analysen forbedres.

Nytten av reagenset ved en nefelomtrisk analyse er beskrevet i detalj ovenfor og er videre illustrert i det følgende eksempel 5.

Det vil være klart for fagfolk at det forbedrede immunologiske reagens ifølge oppfinnelsen har en omfattende anvendelse på området immunologiske prøvemeter. Under anvendelse av det forbedrede reagens kan den kliniske teknikker foreta nøyaktig bestemmelse av et bredt område av konsentrasjoner av mange spesifikke proteiner, f.eks. immunoglobulinene IgG, IgA, IgM, transferrin, komplement C2, haptoglobin, α_1 -antitrypsin, β -lipoprotein, albumin, α_2 -makroglobulin, α_1 -syre glykoprotein og forskjellige andre biologiske bestanddeler så som trijodtyonin (T_3), tyroksin (T_4), triglycerider, menneskelige chorione gonadotropiner, lipoproteiner, og mange andre, hvis bestemmelse vil dra fordel av den økede uoppløseliggjørelsesvirkning som oppnåes ved hjelp av foreliggende oppfinnelse.

På de fleste områder hvor oppfinnelsen kan utnyttes, blandes den ønskede biologiske bestanddel eller bestanddeler med den

149864

vandige reagensoppløsning ifølge oppfinnelsen, inkuberes i en forhåndsbestemt periode som f.eks. ved romtemperatur (20-25°C) i ca. 1 time, og derefter foretaes avlesning på et passende instrument, f.eks. et nefelometer ved en nefelometrisk analyse. Resultatene av måleprøvene sammenlignes med referanseprøver for å bestemme den ukjente konsentrasjon.

De følgende eksempler skal tjene til å illustrere oppfinnelsen ytterligere.

EKSEMPEL 1

En reagensoppløsning fremstilles ved å blande 25 vekt-deler polyetylenglykol med en molekylvekt på 4.000 med 75 vekt-deler "PLURONIC" F-38, og blandingen oppløses i normalt saltvann (0,9% NaCl) til en konsentrasjon på 8 vekt% av blandingen. Denne oppløsning kan enten fortynnes, f.eks. med antiserum, til en blandingskonsentrasjon på 4% (HLB-forhol - 1,115) som i trinn 3 av eksempel 5 nedenfor, før inkubering, og anvendes direkte ved en immunologisk måling, eller den kan holdes i 8% formen inntil den er klar til bruk.

EKSEMPEL 2

Eksempel 1 gjentaes, bortsett fra at polyetylenglykol med en molekylvekt på 6.000 anvendes istedenfor en ekvivalent mengde av 4.000 materialet.

EKSEMPEL 3

Eksempel 1 gjentaes bortsett fra at "PLURONIC" F-68 anvendes istedenfor en ekvivalent mengde av F-38.

EKSEMPEL 4

Eksempel 1 gjentaes bortsett fra at "TETRONIC" 707, 908, 1107, 1307, 1508; "PLURAFAC" 17R8, 25R8, D25, A38 og A39; "PLURONIC" L125, "ARLACEL" 165; og "G-3300" ble anvendt istedenfor F-38 i varierende mengder i en serie av forsøk for å fremstille en rekke forskjellige reagensoppløsninger.

149864

EKSEMPEL 5

De immunologiske reagensoppløsninger fremstilt i eksemplene 1 til 4 anvendes ved separate nefelometriske målinger av immunoglobuliner (IgA, IgG, IgM), komplement C3 og transferrin, idet hver måling utføres som følger:

1. Referanse kontroller // 1, ~~/~~ 2, ~~/~~ 3, ~~/~~ 4, ~~/~~ 5, ~~/~~ 6 (med kjent innhold) for hver av nevnte biologiske bestanddeler fortynnes 1:100 i saltvann.
2. De ukjente prøver fortynnes derefter på samme måte 1:100 i saltvann.
3. Forhåndsfortynnede antiserumer til IgG, IgM, IgA, C3 og transferrin fortynnes hver 1:2 med 8% blandingen av det immunologiske reagens fra eksemplene 1, 2, 3, eller 4 (eftersom det passer) og blandes ved å bli vendt opp ned, for å gi en konsentrasjon på 4% av polyetylenglykol og ikke-ionisk overflateaktivt middel i oppløsningen og en beregnet HLB mellom 0,7 og 1,7 i alle tilfeller.
4. Antiserumet filtreres gjennom et 0,45µ "Millipore" filter.
5. En serie av prøverør (10 mm x 75 mm kultur-rør som kan kastes etter bruk), passende merket blindprøve, referanse kontroller nummer ~~/~~ 1, ~~/~~ 2, ~~/~~ 3, ~~/~~ 4, ~~/~~ 5, ~~/~~ 6, og ukjente prøver gjøres i stand.
6. Til hvert rør settes 1 ml av den fortynnede blanding av antiserum og reagenset fremstilt i trinn 3.
7. Til det passende rør settes 25µl av referanse og ukjente fortynninger for IgG, IgA og transferrin (100 µl for IgM og C3).
8. Det passende blindprøverør tilsettes tilsvarende 25 eller 100 µl saltvann.
9. For å oppnå blanding snues rørene opp ned, og de inkuberes i 1 time ved romtemperatur (20-25°C).
10. Blindprøver fremstilles ved å anvende 1 ml av de filtrerte reagenser fra eksemplene 1 til 4 fremstilt som i trinn 3, bortsett fra at 8% oppløsningen ble fortynnet med saltvann istedenfor antiserum. Blindprøvene anbringes i identisk merkede rør som før trinnene (5 og 6).
11. De samme referanse- og prøvevolumer settes til hver rør som før (trinn 7).

12. Alle rør avleses i "Laser Nephelometer PDQ" (Hyland Laboratories) for relativ prosent lysspredning.
13. Blindprøvene avleses og subtraheres elektronisk fra reaksjonsverdiene av instrumentet.
14. Referanserresultatene avmerkes på lineært kurvepapir som relativ prosent lysspredning som funksjon av konsentrasjonen av referansene.
15. De ukjente verdier bestemmes ved avlesning fra referansekurven.

De immunologiske reagenser ifølge oppfinnelsen som anvendes ved denne undersøkelse, ga vesentlig bedre utfelning antigen-antistoff-kompleksene, mer lineæritet over et større område og høyere følsomhet enn hva som ble oppnådd med et reagens inneholdende polyetylenglykol alene.

EKSEMPEL 6

Dette eksempel beskriver anvendelse av det immunologiske reagens ifølge oppfinnelsen ved en radioimmunomåling for bestemmelse av menneskelig tyroid-stimulerende hormon (HTSH).

En prøve av det immunologiske reagens ifølge oppfinnelsen ble fremstilt ved å blande 8,4 ml av en 5% oppløsning av polyetylenglykol i 0,9% saltoppløsning med 20 ml av 6% "Pluronic" F-38 ikke-ionisk overflateaktivt middel. Blandingens volum ble derefter regulert til 30 ml med 0,9% saltoppløsning for å gi en endelig reagenskonsentrasjon på 1,4% polyetylenglykol og 4,2% F-38.

Radioimmunomålingen ble foretatt som følger:

0,050 ml av kanin-anti-HTSH absorbert med menneskelig choriont gonadotropin (HCG) ble blandet med 200 ml HTSH standarder av varierende styrke. 0,050 ml fosfat buffer, pH 7,4, ble derefter satt til blandingen, og blandingen ble inkubert i 2 timer ved 37°C. På dette tidspunkt ble 0,100 ml HTSH merket med I^{125} tilsatt, og blandingen ble inkubert videre i 3 timer ved 37°C. 1,0 ml av reagenset ifølge oppfinnelsen fremstilt ovenfor ble derefter tilsatt, og blandingen ble inkubert i 1 time ved romtemperatur. På grunn av fortynning av reagenset ved tilsetning av blandingen ble konsentrasjonen av polyetylenglykol og F-38 redusert fra 1,4 og 4,2% til henholdsvis 1 og 3 vekt%. Blandingens ble sentrifugert ved 1000 x g i 10 minutter. Hvis en vasking av de sentrifugerte, faste stoffer er nødvendig, må vaskeoppløsningen inneholde den

149864

samme konsentrasjon som reagenset ifølge oppfinnelsen på det tidspunkt reagenset først ble anvendt ved målingen, dvs. 1% polyetylenglykol og 3% F-38. Væsken på toppen ble derefter avdekantert, og bunnfallet ble tellet. Denne prosess ble gjentatt for en rekke forskjellige HTSH standarder, og man fikk en standard kurve ved å avmerke tellingene oppnådd i forskjellige bunnfall som funksjon av konsentrasjonen av tilsvarende HTSH standard.

Efter at standard kurven var oppnådd, ble målingen foretatt på ukjente måleprøver under anvendelse av fremgangsmåten beskrevet ovenfor, bortsett fra at HTSH standarden ble erstattet med måleprøven. HTSH mengden i måleprøven kunne derefter lett bestemmes på grunnlag av posisjonen av bunnfall-tellingen på standard kurven.

Anvendelse av reagensoppløsningen ifølge oppfinnelsen øket mengden av bunnfall som ble dannet i forhold til det som oppnåes med et reagens inneholdende polyetylenglykol alene, og resulterte i en forbedret radioimmunomåling.

Passende nefelometriske målningsresultater kan også oppnåes uten tilstedeværelse av polyetylenglykol, f.eks. med en vandig oppløsning inneholdende ca. 4 vekt% av blokk-kopolymeren av etylenoksyd og polyoksypropylen-polymer. Blandingen av blokk-kopolymer og polyetylenglykol beskrevet ovenfor, foretrekkes imidlertid for å oppnå optimale resultater.

Det ble foretatt forsøk for å sammenligne forskjellene i graden av antigen-antistoff-kompleks-utfelning som ble oppnådd ved en immunologisk reaksjon utført i nærvær av (1) kombinasjonen av polyetylenglykol (PEG) og ikke-ionisk overflateaktivt middel, (2) PEG alene og (3) det ikke-ioniske overflateaktive middel alene. På grunnlag av de data som ble oppnådd med PEG alene og det ikke-ioniske overflateaktive middel alene, ble den ventede virkning av en kombinasjon av PEG og det ikke-ioniske overflateaktive middel beregnet og sammenlignet med den observerte virkning for kombinasjonen av PEG og ikke-ionisk overflateaktivt middel, for å bestemme hvorvidt den observerte virkning var i overensstemmelse med den beregnede (eller ventede) virkning.

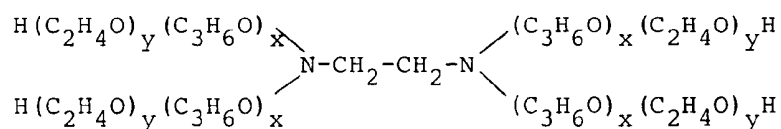
Resultatene oppnådd med "Pluronic F-38" som overflateaktivt middel er illustrert i det følgende:

Gjennomsnittlig prosent lysspredning (nephelometer)				
IgG nivå (mg/dl)	(1)	(2)	(3)	(4)
	1% PEG	3% "Pluronic F-38"	Beregnet 1% PEG + 3% "Pluronic F-38" (1+2)	Virkelig 1% PEG + 3% "Pluronic F-38"
0,3	- 1,5	- 1,5	- 3,0	0
4,68	+ 3,9	- 0,3	+ 3,6	1,5
9,37	+ 1,1	- 1,5	- 0,4	0,2
18,75	- 0,3	- 1,3	- 1,6	6,3
37,5	- 0,2	+ 1,3	+ 1,1	21,4
75	+ 0,9	+33,3	+34,2	71,1

Betydningen av disse resultater er at den virkelige kurve som iakttas for polymerblandingen har en sterkt øket linearitet eller kontinuitet sammenlignet med den ventede kurve. Et lineært forhold mellom prosent lysspredning og konsentrasjonen av antigen eller immunokomponenter som analyseres, er av avgjørende betydning for en diagnosemetode som skal være nyttig. Jo bredere det lineære område er, desto bredere er analyseområdet.

1. Immunologisk reagens for undersøkelse av antigen-antistoff-reaksjoner ved inkubering av materialet som skal undersøkes, i nærvær av reagenset som nedsetter oppløseligheten av antigen-antistoff-komplekset, k a r a k t e r i s e r t v e d a t reagenset inneholder fra 3 til 6 vekt% av en blanding inneholdende 10 til 90 vekt% polyetylenglykol og 90 til 10 vekt% av et ikke-ionisk overflateaktivt middel valgt fra

- a) en blokk-kopolymer av etylenoksyd og polyoksypropylen,
- b) lineære, primære, alifatiske oksyalkylerte alkoholer,
- c) glycerol-monostearat,
- d) polyoler med formelen



e) alkylarylsulfonater.

2. Reagens i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at blandingen er en vandig opløsning inneholdende et antiserum.