

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145346 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(21) Ansøgning nr. 3478/75

(51) Int.Cl.³ C 07 G 7/00

(22) Indleveringsdag 31. jul. 1975

G 01 N 33/54

(24) Løbedag 31. jul. 1975

(41) Alm. tilgængelig 1. feb. 1976

(44) Fremlagt 1. nov. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 31. jul. 1974, 52379/74, IT

(71) Ansøger ANIC S.P.A., Palermo, IT.

(72) Opfinder Onofrio Lostia, IT: Francesco Bartoli, IT.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

(54) Porøse celluloseacetatfibre
indeholdende et biologisk ak=
tivt stof til brug ved gen=
nemførelse af in vitro-reak=
tioner og fremgangsmåde til
fremstilling af fibre.

145346 B

Opfindelsen angår porøse celluloseacetatfibre med mikroporer, hvori der er okkluderet et biologisk aktivt stof til brug ved gennemførelse af in vitro-reaktioner, hvorhos fibrenes porer er af en sådan art, at de forhindrer undslippelse af det okkluderede stof, men tillader indtrængen af det agens, som skal omsættes med stoffet, samt en fremgangsmåde til fremstilling af fibre.

Det er kendt, at betegnelsen "antistof" henfører til stoffer af proteinnatur, som dannes i hvirveldyr af bestemte celler (plasmaceller) som svarer på indgivningen af et antigen, og som specifikt reagerer med dette.

Undersøgelsen af reaktionerne mellem antigen og antistof har stor teoretisk betydning ud fra det synspunkt at opnå en bedre forståelse af molekylernes vekselvirkning, men den har også en praktisk betydning derved, at den kan føre til stadig mere forfinede metoder til diagnose af infektionssygdomme og identifikation af infektiøse midler. Med dette formål analyseres den ene komponent, når den anden er kendt. Hvad angår antigener og antistoffer, er der blevet angivet nogle metoder til insolubilisering ved hjælp af kemiske bindinger mellem de nævnte produkter og polymere materialer, som er uopløselige i vandige opløsningsmidler.

Imidlertid har disse præparater den ulempe, at forbindelserne heri er i vedblivende kontakt med den ydre atmosfære, og at de muligvis kan dispergeres i reaktionsmassen og således forurene produktet selv. Desuden må det bemærkes, at forekomsten af kemiske bindinger kan influere på selve stoffets kemiske natur med mulige skadelige konsekvenser for dets aktivitet.

På den anden side er det ligeledes kendt, at det er muligt at fremstille porøse fibre, som har indlejret enzymer, som ved at immobiliseres således bevarer deres katalytiske egenskaber, medens enzymet samtidigt forhindres i at undslippe og dispergeres i reaktionsmassen og således forurene reaktionsproduktet. De filamentstrukturer, som kan anvendes, og fremgangsmåden til indlejring af enzymet, er beskrevet i dansk fremlæggelsesskrift nr. 133 157, ifølge hvilket de enzymindeslutende fibre kan fremstilles ud fra opløsninger af polymere, som er i stand til at give fibre, hvori der er dispergeret enzympræparater i form af meget små dråber af størrelsesorden som i emulsioner. Den således opnåede emulsion kan spindes under våde eller tørre betingelser til dannelsen af en fiber, som i sit indre har mikroporer, hvori enzymerne er indlejret og udelukkes fra den omgivende atmosfære af en meget tynd membran, der forhindrer enzymet i at undslippe og dispergeres i reaktionsmassen, men alligevel tillader enzymet at udøve dets katalytiske virkning. Selv om det således er kendt fra dansk fremlæggelsesskrift nr. 133 157 at indeslutte enzymer i fibre af bl.a. celluloseacetat, kunne det ikke heraf sluttes, at det også ville være muligt at indeslutte antistoffer, antigener og antisera i fibre, uden at disse ville miste deres aktivitet. De nævnte enzymer er katalysatorer, som blot fikseres af fibre, og som kan udvikle deres aktivitet over for reagenser, som strømmer gennem fiberporerne. Derimod drejer det sig ved antistoffer om reagenser, som selv deltager i kompleksbindingsreaktionen, og således ændres. Det kunne ikke på grundlag af teknikkens stand, som blot angik en katalysator, som kom i kort kontakt med et substrat, forventes, at en kompleksbindingsvirkning kunne udnyttes fuldt ud inden i fibre. Derfor kunne det ikke forudses, at den kompleksbindende (sequestrende) virkning kunne fuldføres inden i fibre, dvs. at antistoffet ville forblive uændret reaktionsdygtigt.

Det har nu vist sig, at det ved anvendelse af lignende metoder som de, der anvendes på enzymer, er muligt at inkorporere antigener, antistoffer eller antisera, enten som sådanne eller polymeriserede, i porøse strukturer, og at de således opnåede præparater ikke udviser de ovennævnte ulemper og heller ingen skadelig sænkning af aktiviteten over for de naturlige proteiner.

I overensstemmelse hermed er fibrene ifølge opfindelsen ejendommelige ved, at det biologisk aktive stof er et antigen, antistof eller antiserum.

De på denne måde opnåede strukturer har høj aktivitet på grund af det høje forhold mellem overfladeareal og volumen; fremgangsmåden til deres fremstilling er simpel og billig at udføre, og den frembyder endvidere muligheden af også at indlejre stoffer, som ikke har en høj renhedsgrad.

Celluloseacetatfibrene ifølge opfindelsen indeholdende antistoffer, antigener og antisera, finder anvendelse inden for forskellige områder, hvori princippet med gensidig specifik reaktivitet altid udnyttes. Hvad angår antisera og antistoffer, kan sådanne fibre således f.eks. anvendes til fra de ydre omgivelser at fjerne antigener, haptener og stoffer konjugeret med proteiner og/eller polypeptider, eller alternativt kan man, når der anvendes indlejrede polymeriserede antigener, fjerne mere eller mindre specifikke antistoffer. Endvidere kan de ovennævnte fibre anvendes til at udføre ekstraktioner af industriel interesse ved selektiv tilhæftning og eventuelt løsgørelse af det tilhæftede antigen eller antistof. Det er også muligt at anvende sådanne fibre ved chromatografiske metoder og nærmere bestemt ved affinitetschromatografi.

Forskellen i molekylvægt mellem de proteiner, som er indlejret i mikroporer i fiberens indre, og de stoffer, som skal bindes dertil, må være tilstrækkelig til at tillade diffusion ind i fiberens indre af de stoffer, som skal bindes, indtil disse når det stof med den højere molekylvægt, som forbliver indelukket i fiberen på grund af dets større molekylvægt.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af de ovennævnte celluloseacetatfibre udføres som tidligere nævnt på en måde, som svarer til fremgangsmåden ved enzymindlejring, og er ejendommelig ved de følgende trin:

- (a) fremstilling af det antigen, antistof eller antiserum, som skal indlejres, og efterprøvning af, at det hæfter ikke-specifikt på fibermaterialet og ikke eller kun uvæsentligt inaktiveres efter behandling med spindeopløsningsmidler,
- (b) opløsning eller suspension af det under (a) fremstillede antigen, antistof eller antiserum i vand eller i en vand/glycerol-blanding,
- (c) tilsætning af opløsningen eller suspensionen (b) til en opløsning af celluloseacetat,
- (d) omrøring, indtil der er opnået en homogen emulsion,
- (e) spinding af emulsionen (d) gennem en spindedyse neddykket i et koaguleringsbad, og
- (f) om nødvendigt fjernelse af koaguleringsvæsken og celluloseacetatopløsningsmidlet fra fiberen ved behandling i en strøm af luft eller en anden gas.

Spindebetingelserne og egenskaberne af de celluloseacetater, som anvendes, er de, som allerede er angivet i beskrivelsen til det førnævnte danske fremlæggeskrift.

Af celluloseacetat-polymere foretrækkes især cellulose-triacetat.

De arbejdsmæssige detaljer vil fremgå tydeligere af de følgende belysende eksempler på udførelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 1

(I) Fremstilling af antisera

Antiseraene opnås i marsvin, kaniner eller andre dyr.

Det stof, over for hvilket man ønsker at opnå antiserummet (antigen eller konjugeret hapten) blandes med "complete Freund adjuvant" og injiceres i medialfladen af køllen på dyrets bagben. Efter 15 og 30 dage gentages injektionen med en lige så stor dosis af immuniseringsmidlet (antigen + Freund adjuvant), og efter 15 dage mere udføres en yderligere immunisering med halv dosis. Derpå tages med 15 dages intervaller intracardiale blodprøver, og på det opnåede serum bestemmes antistoftiteren. Denne bestemmes ved at fremstille fortyndingsrækker af antiserummet med Veronal-puffer, 0,02 molær, ved pH 8,4, indeholdende 0,5 pct. humant serumalbumin og 0,5 pct. normalt serum.

Ved radioimmunologiske prøvningsmetoder findes den fortynding, hvortil der svarer et forhold

$$\frac{\text{Bindingskomponent B}}{\text{Fri komponent F}} = 1$$

Igen med radioimmunologiske prøvningsmetoder bestemmes affiniteten af det opnåede antiserum.

(II) Indledende prøvninger

- A) Prøvninger for ikke-specifik fasthæftning.
- B) Prøvninger for antiserum-inaktivering ved behandling med de opløsningsmidler, som anvendes ved spindingen.
- A) Prøvning for ikke-specifik fasthæftning

I plastikreagensglas afvejedes 50 mg af en fiber opnået efter fremgangsmåden med spinding, koagulering og fjernelse af opløsningsmiddel.

Fiberen indeholdt ikke antiserum eller andre sekvestreringsmidler (forbindelser, der danner stabile komplekser med metalioner), men kun en blanding af vand og glycerol.

Der blev fremstillet tre sæt små reagensglas, nemlig:

- (a) 50 mg fiber plus 2,0 ml fosfatpuffer (som blindprøve);
- (b) 50 mg fiber plus 1,5 ml fosfatpuffer plus 0,5 ml mærket antigen ($\text{Ag-}^{125}\text{I}$);
- (c) 50 mg fiber plus 0,5 ml fosfatpuffer plus 1,0 ml af en opløsning af okseserumalbumin (BSA), 5. fraktion af okseserumprotein, med en koncentration på 2,5 pct. i fosfatpuffer, plus 0,5 ml mærket antigen ($\text{Ag-}^{125}\text{I}$).

Der anvendtes 0,04 molær phosphatpuffer med en pH-værdi på 7,4 og indeholdende 0,5 pct. okse-serumalbumin.

Det mærkede antigen var insulin- ^{125}I med en specifik radioaktivitet på $100\ \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, som tilsattes i forholdet 0,1 μCi pr. 50 mg fiber.

Der anvendtes også digoxin- ^{125}I i ethanolopløsning med en radioaktivitet på 0,25 μCi pr. 0,5 ml, og af denne opløsning tilsattes 0,025 μCi pr. 50 mg fiber.

Begge opløsninger blev bragt til den ønskede fortynding med phosphatpuffer.

En portion af fibre-ne, før tilsætningen af det mærkede antigen, anbragtes i kontakt med opløsningen indeholdende 2,5 pct. okse-serumalbumin i 1 time.

Fibrenes kontakttider med det mærkede antigen varierede fra 40 minutter til 48 timer.

Radioaktiviteterne af de små reagensglas indeholdende fibre-ne blev målt med en gamma-tæller.

Efter kontakttiden blev fibre-ne vasket fem gange med 2 ml phosphatpuffer hver gang, og derpå blev den resterende radioaktivitet målt med en gamma-tæller.

Derefter blev fibre-ne vasket fem gange til, igen med 2 ml phosphatpuffer hver gang, og radioaktiviteten blev målt.

Så blev fibre-ne anbragt i kontakt med 2 ml phosphatpuffer under omrøring ved $37\ ^\circ\text{C}$ i 17 timer, og igen måltes den resterende radioaktivitet. Dette trin blev gentaget to gange til. Det fandtes, at:

- (a) radioaktiviteten forbundet med fibrene forøges gradvist, når kontakttiden med det mærkede antigen er fra 40 minutter til 48 timer;
- (b) forinkubering i 1 time med 2,5 pct. okse-serumalbumin formindsker den mængde radioaktivitet, som forbindes med fiberen;
- (c) med hensyn til den radioaktivitet, som sættes til de små reagensglas, blev det bemærket, at radioaktiviteten nedsættes, efterhånden som antallet af vaskninger forøges, og også efterhånden som fibrenes kontakttid med vaskepufferen forøges; en lille procentmængde radioaktivitet bevares, også efter de ovenfor beskrevne vaskningstrin.

Således blev det konkluderet, at fiberen, ligesom de fleste materialer, også adsorberede på en ikke-specifik måde en lille del af den radioaktivitet, som var til stede i præparatet med det mærkede antigen, og at denne adsorption blev nedsat af okse-serumalbuminet, som mættede en del af modtagestederne i fiberen.

B) Prøvninger for antiserum-inaktivering ved behandling med de opløsningsmidler, som anvendes ved spindingen

Der anvendtes to små glas med et antiinsulin-antiserum som leveret i kommercielle radioimmunoprøvningsudstyr (opnået ved injektion af svineinsulin i marsvin), og til hvert glas sættes 5 ml dobbeltdestilleret vand, således at der blev opnået 10 ml af en opløsning af antiinsulin-antiserum, som blev kaldt Ab_2 . Derpå fremstilledes 20 ml af en blanding af vand og glycerol (volumenforhold 40:60), som blev kaldt Gl_{60} .

Derefter blev der fremstillet følgende blandinger:

(a)	2,5 ml + 2,5 ml 5,0 ml	Ab ₂ <u>destilleret vand</u> Ab ₁
(b)	7,3 ml + 7,3 ml 14,6 ml	Ab ₂ <u>G1₆₀</u> Ab ₁ G1 ₃₀
(c)	5 ml + 32,1 ml	Ab ₁ G1 ₃₀ methylenchlorid

37,5 ml af to faser holdtes i god kontakt ved omrøring i 15 minutter ved 0 °C; efter centrifugering ved stuetemperatur blev den vandige fase fjernet, og fra den blev methylenchloridet afdampet med en nitrogenstrøm. Der blev således opnået 5 ml af en opløsning betegnet som Ab₁G1₃₀^M.

(d)	5 ml + 2 ml	Ab ₁ G1 ₃₀ toluen
-----	----------------	--

7 ml af to faser holdtes i god kontakt ved omrøring i 30 minutter ved stuetemperatur. Efter centrifugering ved stuetemperatur blev den vandige fase skilt fra, og fra den blev toluenet fjernet med en nitrogenstrøm. Der blev til slut opnået 5 ml af en opløsning betegnet som Ab₁G1₃₀^I.

Ved de sædvanlige radioimmunoprøvningsmetoder blev der afsat kalibreringskurver i koncentrationsområdet fra 0 til 200 µE/ml standard-menneskeinsulin under anvendelse af antiserummet som behandlet på de fire forskellige måder angivet ovenfor og betegnet som:

Ab₁
Ab₁G1₃₀
Ab₁G1₃₀^M
Ab₁G1₃₀^I

Af kalibreringskurverne på den vedføjede tegning ses, at der i praksis ikke er nogen sækning i antistoffets bindingsevne som resultat af behandlingen af antiserummet med de opløsningsmidler, som anvendes ved spindingen. På tegningen er B_0 scintillationstællingen (s^{-1}) for referencestandarden, hvis alt antigenet er mærket med ^{125}I , og B er tællingen for prøven. B/B_0 er således et normaliseret mål for bindingen af antigenet til antistoffet.

(III) Fremstilling af fibrene

200 mg celluloseetriacetat opløses i 2,65 g methylenchlorid (reagenskvalitet) ved stuetemperatur.

Det produkt, som skal indlejres, opløses eller dispergeres i vand eller blandinger af vand og glycerol.

0,4 ml af det vandige medium sættes til opløsningen af celluloseetriacetat, som i forvejen er blevet afkølet til 0 °C. Der omrøres, indtil der er opnået en homogen emulsion; denne får derpå lov at stå i 10 minutter.

Dette præparat fremstilles i en glascylinder, hvis top er forbundet til en nitrogencylinder, og hvis bund ender i en spindedyse neddykket i et koaguleringsbad indeholdende toluen.

Ved frembringelse af et nitrogentryk presses emulsionen ud fra spindedyse og koaguleres, idet den passerer ud i toluenbadet. Det resulterende filament opsamles på en rulle og behandles derpå med en luftstrøm for at fjerne både toluen og methylenchlorid.

(IV) Indlejring af antiinsulin-antistoffet

Ved de ovenfor beskrevne metoder fremstilledes i marsvin et antiinsulin-antiserum, hvis antistoftiter fandtes at

være 150 000.

Til 0,2 ml af dette antiserum sættes 0,15 ml af en 0,02 molær Veronal-puffer med pH 8,4, indeholdende 0,5 pct. menneskeserumalbumin og 0,15 ml glycerol (reagenskvalitet).

0,4 ml af denne opløsning sættes til celluloseetriacetatet ifølge fremstillingsbetingelserne for fibre som beskrevet i det foregående.

Med samme apparat udførtes spindingen af en kontrolfiber, hvori der i stedet for 0,2 ml antiserumopløsning anvendtes 0,2 ml af en 0,02 molær Veronal-puffer med pH 8,4 indeholdende 0,5 pct. menneskeserumalbumin.

I små platikreagensglas af den art, som anvendes ved radioimmunoprøvning, anbragtes forskellige mængder fiber som angivet i tabel 1, hvori:

- (a) er rækken af kontrolfibre;
- (b) er rækken af antiserumholdige fibre, som opnået fra spindingen;
- (c) er rækken af antiserumholdige fibre, som efter fuldførelsen af spindingsprocessen er blevet opbevaret i den 0,02 molære Veronal-puffer med pH 8,4 indeholdende 0,5 pct. menneskeserumalbumin og vasket fem gange med 2 ml Veronal-puffer før prøvningens start.

Til hvert lille reagensglas sættes:

- 1,6 ml 0,04 molær fosfatpuffer med pH 7,4 indeholdende 0,5 pct. okseserumalbumin.
- 0,2 ml insulin-¹²⁵I med en specifik aktivitet på 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ og med en fortynding, som indstillede aktiviteten, målt på fremstillingsdagen, til 0,01 $\mu\text{Ci}/0,1$ ml.
- 0,2 ml menneskeinsulin, standard, i en koncentration på 200 $\mu\text{E}/\text{ml}$.

Efter blanding blev de små reagensglas anbragt i et køleskab ved 4 °C i 24 timer. Derpå blev der fra hvert af de små glas udtaget 1,5 ml af opløsningen, hvis radioaktivitet blev målt med en gamma-tæller (Packard model 256) med en effektivitet på 54 pct. for ^{125}I .

Fibrene blev vasket tre gange med 2 ml fosfatpuffer, hvorefter den radioaktivitet, som blev fastholdt af fibrene, blev målt med en gamma-tæller som ovenfor. På de samme fiberprøver gentoges tilsætningerne af reagenserne (puffer, insulin- ^{125}I , standardinsulin), vaskningerne og radioaktivitetstællingerne fire gange til.

Det skal bemærkes, at insulin- ^{125}I , anvendt som mærkningsforbindelse, ikke overskrider 5 pct. af standard-menneskeinsulinet, anvendt som bærer. De opnåede resultater er sammensat i tabel 1, hvorefter det kan ses, at insulinfikseringen, som her betegnes som ikke-specifik, i kontrolfibrene, som ikke indeholder antistoffer, når en maksimumsværdi i det første forsøg og holdes praktisk taget konstant i de efterfølgende forsøg, medens insulinfikseringen i de fibre, som har indlejret antistoffer, forøges hver gang tilsætningen af reagenserne gentages.

Da kontrolfiberen blev fremstillet under stort set samme betingelser som den antistof-indlejrende fiber, må forskellen i optræden udelukkende tilskrives dannelsen af antigen-antistof-bindingen i fiberens indre mellem det indlejrede antiinsulin og det insulin-antigen, som er til stede i mediet.

TABEL 1

F O R S Ø G

F I B E R

Prøve nr.	Vægt (mg)	1.	2. (tælling pr. 10 minutter)	3.	4.	5.
Kontrol- række	a ₁	7,0	6 822	5 059	2 703	2 579
	a ₂	12,5	12 716	11 162	5 567	4 966
	a ₃	18,4	15 328	13 405	5 132	5 543
	a ₄	25,0	16 060	16 595	6 594	6 983
	a ₅	33,7	15 317	20 919	9 564	8 474
	a ₆	41,8	22 412	22 695	11 668	11 960
Antiserum- holdig række	b ₁	7,1	22 895	39 193	48 025	57 800
	b ₂	12,7	44 149	73 026	80 498	87 945
	b ₃	16,1	28 299	49 550	58 295	66 435
	b ₄	22,1	45 831	79 268	90 734	100 182
	b ₅	33,6	54 870	119 867	135 862	150 248
	b ₆	40,5	50 910	116 575	135 154	152 010
Antiserum- holdig række under- kastet vaskning for brug	c ₁	9,8	32 593	52 763	67 770	74 800
	c ₂	11,3	39 403	65 432	79 011	84 292
	c ₃	12,3	43 554	66 607	83 098	97 018
	c ₄	12,1	42 794	68 325	82 292	94 203
	c ₅	40,1	50 883	104 108	121 027	132 263
	c ₆	42,7	-	66 490	89 960	99 300
	c ₇	32,4	-	53 654	70 901	82 805

EKSEMPEL 2

Ved den procedure, som er beskrevet ovenfor, fremstilledes i marsvin et anti-HGH-antiserum (HGH=humant væksthormon), hvis antistoftiter fandtes at være 2 000.

Til 0,2 ml af dette antiserum sættes 0,15 ml af en 0,02 molær Veronal-puffer, pH 8,4, indeholdende 0,5 pct. menneskeserumalbumin og 0,15 ml glycerol (reagenskvalitet).

Med det samme apparat som ovenfor udførtes spindingen af en kontrolfiber, hvori der i stedet for 0,2 ml af antiserumopløsningen anvendtes 0,2 ml af en 0,02 molær Veronal-puffer, pH 8,4, indeholdende 0,5 pct. menneskeserumalbumin.

I små plastreagensglas af den art, som anvendes til radioimmunoprøvninger, anbragtes forskellige mængder fibre som angivet i tabel 2, hvori:

- (a) er rækken af kontrolfibre, og
- (b) er rækken af antiserumholdige fibre, som opnået ved spindingsprocessen.

Til de to rækker små reagensglas (8 små glas for hver række) sættes:

- 1,6 ml af en 0,13 molær boratpuffer, pH 8,4, indeholdende 0,5 pct. okseserumalbumin;
- 0,2 ml HGH-¹²⁵I med en specifik aktivitet på 150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ og med en fortynding, som bragte aktiviteten, målt på fremstillingsdagen, til 0,015 $\mu\text{Ci}/0,1$ ml;
- 0,2 ml standard-HGH i de koncentrationer, som er angivet i tabel 2.

Efter blanding blev de små reagensglas anbragt i et køleskab ved 4 °C i 24 timer. Derpå blev der fra hvert lille glas udtaget 1,5 ml opløsning, hvis radioaktivitet blev målt med en

gamma-tæller (Packard, model 256) med en effektivitet på 54 pct. for ^{125}I .

Fibrene blev vasket tre gange med 2 ml boratpuffer hver gang, hvorefter den radioaktivitet, som var fikseret i fibrene, blev målt med en gamma-tæller som nævnt ovenfor. På de samme fiberprøver gentoges en gang til tilsætningerne af reagenserne (puffer, HGH- ^{125}I , standard-HGH), vaskningerne og radioaktivitetstællingerne. De opnåede resultater er angivet i tabel 2. Det ses, at der i fibrene, som indeholder anti-HGH-antistoffet, især efter det andet forsøg, ved alle koncentrationsniveauerne af tilsat HGH er en mængde fikseret radioaktivitet, som er større end i de tilsvarende kontrolfibre, som ikke indeholder antiserum i deres indre, men som er blevet behandlet på stort set den samme måde som de, der har antiserummet indlejret.

Det skal bemærkes, at det anvendte anti-HGH-antiserum har en titer på 2 000, og således er det specifikke "sequesterings"-fænomen (den specifikke reciprokke antigen-antistof-virkning) mindre iøjnefaldende end det, som vistes for prøvningen i eksempel 1, hvori der anvendtes et antiinsulin-antiserum med en titer på 150 000.

Den specifikke fiksering på grund af antigen-antistof-bindingen i fibrene, som indeholder anti-HGH-antistofferne, er imidlertid utvivlsom også i dette tilfælde.

TABEL 2

F I B E R		Koncentration af den tilsatte standard HGH (µg/ml)	F O R S Ø G	
Prøve nr.	Vægt (mg)		1. (tælling pr. 10 minutter)	2.
a ₁	10,1	1,25	5 1 6	6 453
a ₂	10,0	10	5 772	5 959
a ₃	10,2	10	5 739	7 529
a ₄	9,7	-	4 080	4 523
a ₅	10,1	20	5 093	6 756
a ₆	9,6	-	3 799	4 783
a ₇	9,7	50	3 970	4 890
a ₈	9,9	-	4 500	5 233
b ₁	9,6	1,25	6 239	9 169
b ₂	10,4	-	6 029	9 492
b ₃	10,2	10	6 266	9 112
b ₄	10,5	-	5 616	8 779
b ₅	10,0	20	5 259	7 739
b ₆	10,2	-	5 653	8 163
b ₇	9,8	50	4 943	6 736
b ₈	9,8		5 366	7 899

Kontrolrække

Antiserumholdig række

EKSEMPEL 3

Ved de procedurer, som er beskrevet ovenfor, fremstilledes et anti-triiodtyronin-antiserum ved indpodning af triiodtyronin bundet til menneskeserumalbumin i kaniner. På det opnåede antiserum bestemtes en antistoftiter på 4 000. Til 0,2 ml af serummet sættes 0,15 ml af en 0,08 molær Veronal-puffer, pH 7,5, indeholdende 0,5 g/liter menneskeserumalbumin og 0,15 ml glycerol.

0,4 ml af opløsningen blev indlejret i 200 mg celluloseetriacetat ifølge den allerede beskrevne fiberfremstillingsprocedure.

Ved den samme procedure fremstilledes en kontrolfiber, hvori der i stedet for antiserumopløsningen i 200 mg celluloseetriacetat var indlejret 0,4 ml af en opløsning opnået ved at blande 0,35 ml af en 0,08 molær Veronal-puffer, pH 7,5, indeholdende 0,5 g/liter menneskeserumalbumin, og 0,15 ml glycerol.

50 mg af den antistofholdige fiber og 50 mg af kontrolfiberen uden antistof anbragtes i to små reagensglas af plastmateriale og blev vasket fem gange med 2 ml af den ovenfor beskrevne Veronal-puffer.

Derpå sættes til hvert af de små reagensglas:

- 2 ml 0,08 molær Veronal-puffer, pH 7,5, indeholdende 0,4 g/liter menneskeserumalbumin og 4 mg/liter triiodtyronin; og
- 0,2 ml triiodtyronin-¹²⁵I med en specifik aktivitet på 90 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ fortyndet til en aktivitet på 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$.

Efter blanding blev de små reagensglas anbragt i et køleskab ved 4 °C i 24 timer.

Derpå blev fibrene befriet for opløsningen indeholdende reagenserne og vasket fem gange med 2 ml af den ovenfor beskrevne Veronal-puffer.

Derpå blev tilsætningerne af reagenserne og vaskningerne gentaget for anden gang, som angivet ovenfor.

Til sidst blev den i fibrene tilstedeværende radioaktivitet målt med den førnævnte gamma-tæller.

På kontrolfiberen uden antistoffer blev der målt en tælling på 45 000 pr. 10 minutter; på fiberen, som indeholdt antistoffet, blev der målt en tælling på 146 000 pr. 10 minutter.

EKSEMPEL 4

Ved de allerede beskrevne procedurer blev der fremstillet et anti-(letkæde λ og κ)-antistof med koncentrationer på 25 mg/ml i en fysiologisk opløsning pufret til pH 7,3 med 0,01 molært natriumphosphat. (Letkæde λ og letkæde κ er polypeptider med en molekyelvægt på ca. 22 000, som indgår i immunoglobuliner, se Bellanti, "The Principles of Immunology", ed. Saunders, Philadelphia 1971, side 101-107, især side 104).

Til 0,35 ml af denne opløsning sættes 0,15 ml glycerol.

0,4 ml af den sidstnævnte opløsning blev indlejret i 200 mg celluloseetriacetat ved den allerede beskrevne procedure. Under anvendelse af den samme spindingsprocedure blev der i en kontrolfiber indlejret 0,4 ml af den allerede beskrevne puffer.

100 mg af den antistofholdige fiber og 100 mg af kontrolfiberen blev anbragt i to små plastreagensglas. Fibrene blev vasket fem gange med 2 ml 0,01 molær fosfatpuffer, pH 7,3.

Derpå sættes til de små glas 1 ml 0,01 molær fosfatpuffer, pH 7,3 indeholdende 0,9 pct. natriumchlorid og 0,5 mg/ml letkæder λ og κ .

De små reagensglas blev holdt i 2 timer ved 22 °C og i yderligere 22 timer ved 4 °C.

Efter inkubation blev opløsningerne udtaget fra de små glas, og fibrene blev vasket fem gange med 1 ml 0,01 molær fosfatpuffer, pH 7,3, indeholdende 0,9 pct. natriumchlorid.

Vaskevæskerne blev kombineret med de opløsninger, som blev udtaget fra glassene efter inkubation, og proteinkoncentrationen på den således opnåede opløsning bestemtes ved Lowry-metoden.

I de opløsninger, som havde været i kontakt med kontrolfiberen, målttes 0,447 mg proteiner. I de opløsninger, som havde været i kontakt med den antistofholdige fiber, målttes 0,385 mg proteiner. De tilsatte 0,5 mg letkæder λ og κ er således næsten helt udvasket fra kontrolfiberen, medens en væsentlig mængde er tilbageholdt på den antistofholdige fiber.

P a t e n t k r a v :

1. Porøse celluloseacetatfibre med mikroporer, hvori der er okkluderet et biologisk aktivt stof til brug ved gennemførelse af in vitro-reaktioner, hvorhos fiberens porer er af en sådan art, at de forhindrer undslippelse af det okkluderede stof, men tillader indtrængen af det agens, som skal omsættes med stoffet, k e n d e t e g n e t ved, at det biologisk aktive stof er et antigen, antistof eller antiserum.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af porøse celluloseacetatfibre ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, de følgende trin:

- (a) fremstilling af det antigen, antistof eller antiserum, som skal indlejres, og efterprøvning af, at det hæfter ikke-specifikt på fibermaterialet og ikke eller kun uvæsentligt inaktiveres ved behandling med spindeopløsningsmidler,
- (b) opløsning eller suspension af det under (a) fremstillede antigen, antistof eller antiserum i vand eller blandinger af glycerol og vand,
- (c) tilsætning af opløsningen eller suspensionen (b) til en opløsning af celluloseacetat,
- (d) omrøring, indtil der er opnået en homogen emulsion,
- (e) spinding af emulsionen (d) igennem en spindedyse neddykket i et koaguleringsbad, og
- (f) om nødvendigt fjernelse af koaguleringsvæsken og celluloseacetat-opløsningsmidlet fra fiberen ved behandling i en strøm af luft eller en anden gas.

Fremdragne publikationer:

DK ans.nr. 3427/69 (patent nr. 133157),
DE offentliggørelsesskrifter nr. 2244080, 2263289.

