

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144543 B



- (21) Ansøgning nr. 3905/75 (51) Int.Cl.<sup>3</sup> G 01 N 27/26  
(22) Indleveringsdag 29. aug. 1975 G 01 N 33/50  
(24) Løbedag 29. aug. 1975  
(41) Alm. tilgængelig 1. mar. 1976  
(44) Fremlagt 22. mar. 1982  
(86) International ansøgning nr. -  
(86) International indleveringsdag -  
(85) Videreførelsesdag -  
(62) Stamansøgning nr. -  
(30) Prioritet 30. aug. 1974, 2441536, DE
- (71) Ansøger BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, Marburg/Lahn, DE.
- (72) Opfinder Franz Porzsolt, DE: Christoph Tautz, DE: Rudolf  
Schmidtberger, DE: Wolfgang Ax, DE: Burkhard Enders, DE.
- (74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

- (54) Diagnostisk fremgangsmåde in vitro,  
ved hvilken lymfocytter inkuberes  
med antigener.

Den foreliggende opfindelse angår en diagnostisk fremgangsmåde in vitro, ved hvilken lymfocytter inkuberes med antigener, inkubationsblandingen eller den cellefri ovenstående væske sættes til en dispersion af indikatorpartikler, som indgår vekselvirkninger med inkubationsblandingen eller den cellefri ovenstående væske, hvorved partiklernes opførsel ændres måleligt, når disse partiklers vandringshastighed måles i et elektrisk felt.

Det er kendt, at lymfocytter hos patienter med forskellige sygdomme kan stimuleres ved hjælp af antigener på den måde, at de frigiver substanser, ved hjælp af hvilke vandringshastigheden af mar-svinemakrofager ændres i det elektriske felt. Dette princip indfør-

DK 144543 B

tes af E.J. Field og E.A. Caspary, *The Lancet*, 1970, side 1337-1341 til brug ved tumordiagnostik. I mellemtiden er det blevet kendt at anvende denne metode til identificering og differentialdiagnose af en række andre sygdomme, som f.eks. bronchial astma, multipel sclerose, scrapie, neurologiske sygdomme og skjoldbruskkirtelsygdomme, samt endvidere til overvågning af thymuskirtlens funktion. I transplantationsimmunologien kan fremgangsmåden anvendes til donor-modtager-udvælgelse og til observation af posttransplantationssituationen. Makrofagernes ændrede vandringshastighed kan måles i i handelen værende celleelektroforeseapparaturer (cytopherometre) og udnyttes i den kliniske diagnostik.

Den af Field og Caspary, jfr. ovenfor, eller J.A.U. Pritchard et al, *Br. J. Cancer*, 27, 1-9 (1973) indførte metode er især baseret på den uheldige forestilling, at der nødvendigvis må anvendes makrofager. Disse kan kun ved en kostbar teknik tilvejebringes fra sunde forsøgsdyr som marsvin og er kun anvendelige i kort tid. Ved præparationen af makrofager fra marsvin fås en række forskellige cellepopulationer, som vandrer med forskellig hastighed i det elektriske felt. Derfor skal der til målingen udvælges en bestemt population, hvilket indebærer et yderligere problem ved denne metode. Makrofager fra syge dyr kan ikke anvendes i Field og Caspary's testsystem.

Der har derfor været et behov for at erstatte makrofagerne med ladede indikatorpartikler af vidtgående homogen størrelse og form, som på grund af deres stabilitet muliggør anvendelse over længere tid, og som på grund af ensartetheden af den elektriske ladning og på grund af udseendet muliggør en forenklet bedømmelse af målingen i den elektroforetiske vandring.

Det har nu vist sig, at der til den diagnostiske fremgangsmåde i stedet for makrofager kan anvendes visse partikler, som i et elektrisk felt udviser en i det væsentlige enartet opførsel, som indgår bindinger eller i videste forstand vekselvirkninger med tilsvarende forsøgssubstanser, såsom et lymfocyt-medium, på en sådan måde, at partiklernes opførsel i det elektriske felt ændres måleligt, og som direkte kan observeres eller måles med et passende apparat. Ifølge opfindelsen anvendes der således som indikatorpartikler tannerede (dvs. med tannin behandlede) og eventuelt med sulfosalicylsyre behandlede erythrocyter.

Opfindelsen angår således en diagnostisk fremgangsmåde in vitro af den i det foranstående angivne art, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der som indikatorpartikler anvendes tannerede og eventuelt med sulfosalicylsyre behandlede erythrocyter.

Den kemiske natur af de i den ovenstående væske indeholdte faktorer, som er i stand til at indgå vekselvirkninger med indikatorpartiklerne, har hidtil været ukendt. Genstand for diskussion er således f.eks. lymfocytprodukterne "macrophage slowing factor (MSF)" og "migration inhibition factor (MIF)". I betragtning som antigener kommer sådanne, som er almindeligt opløselige i vandige medier, men også partikulære antigener, såsom celler eller formede cellebestanddele. Til de opløselige antigener hører antigener af mikroorganismer og højere stående levende væsener, vegetabiliske lektiner (dvs. planteproteiner, som indgår en specifik binding med carbonhydratandelene af glycoproteiner og -lipider) samt andre antigener af naturlig eller syntetisk herkomst.

Ved anvendelse af det antigen, som er specifikt for diagnosen af en bestemt immunitet, stimuleres lymfocytter fra en observationspatient, som reagerer med dette antigen. De i den omgivende opløsning afgivne substanser ændrer indikatorpartiklernes overskudsladning i sammenligning med indikatorpartiklerne, som er tilvejebragt med medier fra inkubation af lymfocytter fra ikke-reagerende personer og det samme antigen. Som specifikke antigener for diagnostik er f.eks. antigener som tuberkulin, tetanus-toxoid og streptokok-antigener anerkendt som målestok for den celleformidlede immunitet. Derudover kendes nogle få specifikke antigener, hvis påvisning henviser til forekomsten af almindelige sygelige afsporinger i legemet. F.eks. eksisterer en sammenhæng mellem den encephalitogene faktor (EF) og kræft.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes lymfocytter fra observationspatienten fra dennes blod eller lymfe eller væv fra lymfoide organer. Ved anvendelse af blod bliver dette gjort ukoagulerbart, og dette kan f.eks. opnås ved tilsætning af heparin. Lymfocytterne tilvejebringes efter en af de kendte fremgangsmåder. Blodprøven anbringes f.eks. på en med glasperler fyldt søjle, hvorpå adhærente celler bliver hængende. Lymfocytterne udvindes af eluatet ved gradientcentrifugering, hvorpå de inkuberes med det diagnostiske antigen i 60 min. til 24 timer ved 20-37°C med et for-

hold mellem antigen og lymfocytter, som er konstant under hele forsøget. Inkubationsblandingen af antigen og lymfocytter eller den fra lymfocytterne isolerede ovenstående inkubationsvæske anvendes til ladning af de indikatorpartikler, som anvendes i stedet for makrofager. Hertil behandles indikatorpartiklerne, nemlig tannede erythrocyter, og især sådanne, som stabiliseres yderligere med sulfosalicylsyre efter den af Becht indførte fremgangsmåde (J. Immunol. 101, 18-22 (1968)), i en suspension af  $1 \times 10^7$  til  $5 \times 10^7$  pr. ml med inkubationsblandingen eller den ovenstående inkubationsvæske og inkuberes i 30-120 min. ved  $20-40^{\circ}\text{C}$ .

Forholdet antigen til lymfocytter bestemmes i et forudgående forsøg, i hvilket der til et konstant antal på ca.  $0,5$  til  $1 \times 10^6$  lymfocytter/ml medium tilsættes en stigende mængde antigen, hvorefter den optimale påvirkning af indikatorpartiklernes vandringshastighed registreres.

Den herefter tilvejebragte suspension af de behandlede indikatorpartikler tilføres et celleelektroforesesystem, som muliggør registrering af vandringshastigheden. Bestemmelsen sker ved konstatering af den elektroforetiske vandringshastigheds afvigelse fra nulværdien og værdien hos ikke-reagerende kontrolpersoner. Hvis f.eks. den encephalitogene faktor (EF) som antigen inkuberes med lymfocytter fra en patient, som mistænkes for at have tumorer, og hvis inkubationsmediet bevirker en nedsættelse af den elektroforetiske bevægelighed af de dermed behandlede erythrocyter i forhold til erythrocyter, som kun er inkuberet med et fysiologisk acceptabelt inkubationsmedium (nulværdi), og i forhold til erythrocyter hidrørende fra et inkubationsmedium af efter inkubation med EF ikke-reagerende lymfocytter fra kontrolpersoner, (normalværdi), vurderes diagnosen patologisk.

Hvis f.eks. tetanus-toxoid eller rensset tuberkulin som antigen inkuberes med lymfocytter, og hvis inkubationsmediet bevirker en nedsættelse af den elektroforetiske bevægelighed af de dermed ladede erythrocyter i forhold til erythrocyter, som inkuberes med den ovenstående væske fra en antigenfri lymfocytkultur, foreligger der hos patienten en sensibilisering mod det anvendte antigen. Det positive resultat gælder endvidere som målestok for den cellulære immunitetssituation hos lymfocytpatienten.

Såfremt der i stedet for et opløseligt antigen inkuberes 0,5 til  $2 \times 10^6$  lymfocytter fra en anden patient som antigen sammen med 0,5 til  $2 \times 10^6$  lymfocytter fra den første patient som en "blandet lymfocytkultur", og såfremt der i overensstemmelse med opfindelsen sættes fra 1 til  $5 \times 10^7$  indikatorpartikler til denne blanding, er det muligt på grundlag af partiklernes vandrings-hastighed i det elektriske felt at bestemme graden af de to lymfocytpopulationers uforenelighed. Af forsøgsresultatet har man draget slutninger med hensyn til patienternes slægtskabsgrad i videre betydnings. Vigtige anvendelsesområder er genetiske studier og undersøgelser inden for rammerne af organtransplantationer.

I forhold til den almindelige blandede lymfocytkultur, hvis resultat foreligger efter 5-6 dage, kan man med det elektroforetiske system under anvendelse af indikatorpartikler få resultatet allerede efter ca. 2 timer.

I det følgende illustreres fremgangsmåden ifølge opfindelsen nærmere ved en række eksempler.

#### Eksempel 1

I en sprøjte med 0,5 ml heparin udtages fra observationspatienten 23 ml venøst blod. Blodprøven hældes på en søjle (2 cm diameter, 30 cm højde) fyldt med glasperler (2 mm diameter) og henstår i varmeskab i 90 minutter ved  $37^{\circ}\text{C}$ . Derefter fortyndes eluatet i søjlen i forholdet 1:4 med Hanks' opløsning med et indhold på 0,05% af  $\text{Na}_2$ -salte af ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA). Det fortyndede eluat overhældes over 1/4 af sit volumen med et lag af en opløsning bestående af natrium-, calcium-, magnesium- og methylglucaminsalte af metrizoesyre ("Ronpacon"<sup>®</sup>, Cilag-Chemie GmbH, Alsbach) og med et lag af en høj molekylær copolymer af saccharose og epichlorhydrin ("Ficoll"<sup>®</sup>, Pharmacia, Uppsala) med vægtfylde 1,074 og centrifugeres i 15 minutter ved 250 g. Den over vægtfyldegradienten liggende lymfocytring udtages og vaskes én gang med Hanks' + EDTA opløsning og derefter to gange med Hanks' opløsning. Cellerne centrifugeres fra og optages i 0,5 ml Dulbecco-medium uden serum.

Dulbecco's medium er et kulturmedium til celledyrkning og består af en blanding af aminosyrer, vitaminer, uorganiske salte, puffersubstanser og antibiotika. Det er en almindelig handelsvare.

Celletallet bestemmes i Coulter-Counter (fabrikant: Coulter Electronics, Krefeld), og lymfocyt-suspensionen indstilles på  $1 \times 10^7$  celler med Dulbecco-medium. Pr. 0,7 ml af denne celledespen-

sion tilsættes 3 ml af opløsningen af den encephalitogene faktor (EF) (0,3 mg EF pr. 1 ml Hanks') og inkuberes i 24 timer. Derefter centrifugeres lymfocytterne fra, og 3 ml af den ovenstående væske inkuberes 1-2 timer med 1 ml af en cellesuspension ( $5 \times 10^7$  efter Becht-metoden stabile og tannede erythrocyter pr. ml Hanks'). Erythrocyterne fremstilles på den måde, at erythrocyter fra beder behandles i suspension med tannin i forholdet 1:20.000 og derpå med så megen sulfosalicylsyre, at der fremkommer en 2%'s opløsning. De behandlede erythrocyter vaskes, der fremstilles en 20%'s (vægt/rumfang) erythrocytsuspension, og denne lyophiliseres.

Herefter måles denne cellesuspension i et cytopherometer, og partiklernes elektroforetiske vandring vurderes diagnostisk med henblik på forekomsten af en kræftsygdom.

Et cytopherometer er et mikroskop, som tjener til bestemmelse af den elektriske overfladeladning af suspenderede mikroskopiske partikler på grundlag af disses vandringshastighed i det elektriske felt (elektroforese). Den dertil anvendte suspension befinder sig i målekammeret af et såkaldt elektroforesesystem. Mikroskopets optiske akse befinder sig i vandret stilling, da målekammeret skal stå lodret. Derved elimineres påvirkninger, som kan forfalske målingen af vandringshastigheden.

#### Eksempel 2

Såfremt der som i eksempel 1 i stedet for EF anvendes 3 ml af en opløsning af rensset tuberkulin (150.000 E/ml), muliggør målingen af partiklernes elektroforetiske vandring diagnosen af en observationspatients sensibilisering over for rensset tuberkulin.

#### Eksempel 3

Såfremt der som i eksempel 1 i stedet for EF anvendes 3 ml af en opløsning af tetanus-toxoid (20 L f/ml), muliggør målingen af partiklernes elektroforetiske vandring diagnosen af en observationspatients sensibilisering over for tetanus-toxoid eller toxin.

#### Eksempel 4

20 ml med heparin blandet, venøst blod fra en observationspatient fortyndes 1:2 med Hanks' opløsning og hældes på en tolags-gradient, hvor hvert lag består af en 30 ml opløsning med forskel-

lig vægtfylde, dvs. et øverste lag A bestående af natrium-, calcium-, magnesium- og methylglucaminsalte af metrizoesyre ("Ronpacon" <sup>®</sup>, Cilag-Chemie GmbH, Alsbach) og af en høj molekylær copolymer af saccharose og epichlorhydrin ("Ficoll" <sup>®</sup>, Pharmacia, Uppsala) med vægtfylde 1,077, og et nederste lag B bestående af de nævnte substanser, dog med vægtfylde 1,119. Fortyndingen, som er hældt på gradienten, centrifugeres i 20 minutter ved 800 g. Den over laget A liggende lymfocytring udtages og vaskes tre gange i Hanks' opløsning, og de således tilvejebragte lymfocytter optages i Dulbeccomedium. De dannede blodbestanddele, som forstyrrer målingen, især granulocytter og erythrocyter, befinder sig ved grænselaget mellem lag A og B, eller på bunden af gradientbeholderen.

Som forsøgsblanding anvendes  $1 \times 10^6$  lymfocytter blandet med  $5 \times 10^7$  indikatorpartikler (tannerede og sulfosalicylsyrebehandlede erythrocyter), idet antigenet EF forinden tilsættes i en koncentration på 0,3 mg/ml til et totalvolumen på 3,5 ml. Efter inkubation i 60 minutter anbringes blandingen i et cytopherometer, og den elektroforetiske vandring af de i blandingen indeholdte indikatorpartikler bestemmes. Nedsættelsen af indikatorpartiklernes vandringshastighed muliggør en konstatering af forekomsten af en malign sygdom hos observationspatienten. Som kontrol tjener en tilsvarende forsøgsblanding under udeladelse af antigenet.

#### Eksempel 5

Hvis lymfocytterne fra en observationspatient som i eksempel 4 i forsøgsblandingen i stedet for et opløseligt antigen, EF, blandes med  $1 \times 10^6$  lymfocytter fra en ikke beslægtet anden observationspatient som antigen, og disse inkuberes som en blandet lymfocytkultur, og hvis der til denne blanding som i eksempel 4 sættes  $5 \times 10^7$  indikatorpartikler, er det muligt efter måling af indikatorpartiklernes vandringshastighed i et cytopherometer at konstatere graden af uforenelighed mellem de to lymfocytpopulationer eller mellem observationspatienterne på tilnærmelsesvis samme måde som ved en patient-modtagerudvælgelse ved organtransplantation.

P a t e n t k r a v .

Diagnostisk fremgangsmåde in vitro, ved hvilken lymfocyter inkuberes med antigener, inkubationsblandingen eller den cellefri ovenstående væske tilsættes til en dispersion af indikatorpartikler, som indgår vekselvirkninger med inkubationsblandingen eller den cellefri ovenstående væske, hvorved partiklernes opførsel ændres måleligt, når disse partiklers vandringshastighed måles i et elektrisk felt, k e n d e t e g n e t ved, at der som indikatorpartikler anvendes tannerede og eventuelt med sulfosalicylsyre behandlede erythrocyter.

Fremdragne publikationer:  

---