

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 165466 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1346/86

(51) Int.Cl.5

G 01 N 33/531

(22) Indleveringsdag: 24 mar 1986

G 01 N 33/569

(41) Alm. tilgængelig: 30 sep 1986

G 01 N 33/574

(44) Fremlagt: 30 nov 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 29 mar 1985 US 717345

(71) Ansøger: *HYBRITECH INCORPORATED; 11095 Torreyana Road; San Diego, CA 92126, US

(72) Opfinder: Tina Susan *Berger; US, Linda Patricia *Ivor; US

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af en stabil biologisk væske til anvendelse som baggrundsmateriale ved immunassaymålinger, samt anvendelse af en sådan stabil biologisk væske som materiale ved kalibrering, som fortyndingsmiddel og i et immunassay baseret på monoklonalt antistof

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag:

1346-86

Fremgangsmåder til fremstilling af stabile naturlige baggrundsmaterialer for prostata-specifikt antigen PSA, hvor biologiske bærer væsker for PSA fra egnede pattedyr modificeres, hvorved man hæmmer aktiviteten af komponenter i de biologiske væsker, der destabiliserer PSA. De stabile naturlige baggrundsmaterialer fremstillet ifølge opfindelsen kan anvendes ved måling af PSA i en prøve ved hjælp af et immunassay.

DK 165466 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af en stabil biologisk væske til anvendelse som baggrundsmateriale ved målingen af prostata-specifikt antigen (PSA) i en væskeformig prøve ved hjælp af et immunassay samt anvendelse af en således fremstillet stabil biologisk væske som materiale ved kalibrering, som fortyndingsmiddel og i et immunassay baseret på monoklonalt antistof.

Prostata-specifikt antigen (PSA), et godt karakteriseret antigen associeret med tumorer, er en betydningsfuld diagnostisk og prognostisk markør ved human prostata-carcinom. Som følge af, at prostata-tumorer frigør PSA til blodstrømmen, vil koncentrationen af PSA i serum og andre kropsvæsker korrelere med væksten af primære eller metastatiske carcinomer. Derfor vil en kvantitativ bestemmelse af PSA i prøver fra patienter give læger et effektivt middel til at kontrollere en terapi og vurdere, om sygdommen er fremadskridende eller på tilbagetogt.

Kendte immunassays til måling af PSA i prøver fra patienter, såsom immunradiometrisk assay (IRMA) og enzymbaseret immunsorbentassay (ELISA) hviler på anvendelse af kunstige eller syntetiske baggrundsmaterialer, såsom serumalbumin fra køer, som kalibreringsbaggrundsmaterialer og som fortyndingsmidler. I denne forbindelse vil "kalibreringsbaggrundsmateriale" betyde et baggrundsmateriale, i hvilket forudbestemte koncentrationer af et antigen kan opretholdes til brug for kalibrering af ukendte koncentrationer af antigenet i prøver fra patienter. Betegnelsen "fortyndingsmiddel" vil betyde et baggrundsmateriale benyttet til fortynding af prøver fra patienter, hvori koncentrationen af antigen er større, end immunassayet kan dække, hvorved det tillades, at man kan måle antigenet ved hjælp af immunassayet.

Disse baggrundsmaterialer benyttes, fordi umodificerede naturlige baggrundsmaterialer, såsom baggrundsmaterialer baseret på serum, anses for uegnede

på grund af at PSA er instabilt, når det indføres i sådanne baggrundsmaterialer. Man har især vist, at der foregår et tab på 30-70% af PSA-aktivitet indenfor 24 timer efter, at det er indført i ikke modificerede baggrundsmaterialer baseret på menneskeligt serum. Ydermere er dette tab af målelig PSA ikke begrænset til serum fra mennesker, idet PSA også er ustabilt, når det indføres i baggrundsmaterialer baseret på serum fra køer eller heste.

Da komponenterne i sådanne baggrundsmaterialer er forskellige fra komponenterne i analyseprøver, vil bindingskinetikken og den ikke specifikke bindingskarakteristik af kunstige baggrundsmaterialer kunne afvige kraftigt fra serum eller andre kropsvæsker, der indeholder eller mistænkes for at indeholde PSA. Anvendelse af disse baggrundsmaterialer vil derfor i sig selv være en alvorlig begrænsning på immunassays for PSA.

Det er meget vigtigt, når immunassays for PSA skal gøres så nøjagtige og følsomme som muligt, at baggrundsmateriale til kalibrering og fortynding skal minde så meget som muligt om analyseprøver fra patienten, især hvad angår ikke specifik bindingskarakteristik.

Der er følgelig et behov for midler til stabilisering af PSA i naturlig baggrundsmaterialer, såsom serumbaserede baggrundsmaterialer, så de kan benyttes til kvantitativ bestemmelse af PSA i prøver fra patienter.

Opfindelsen tilvejebringer fremgangsmåder til stabilisering af prostata-specifikt antigen (PSA) i naturlige baggrundsmaterialer. I denne sammenhæng har vi uventet fundet, at naturlige baggrundsmaterialer med bindingskinetik og uspecifik bindingskarakteristik, der minder om hvad man finder i patientprøver, kan modificeres på en måde, så PSA er stabilt deri, uden at man herved i væsentlig grad ændrer deres ønskede egenskaber som baggrundsmaterialer.

I overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at man modificerer en biologisk bærer væske indeholdende PSA fra et egnet pattedyr ved at væskens pH hæves og derefter holdes konstant i et passende tidsrum, hvorefter pH ændres til den oprindelige værdi.

Ifølge opfindelsen benytter man biologiske væsker fra et egnet pattedyr med bindingskinetik og ikke specifik bindingskarakteristik, der er lig med eller i det væsentlige lig med hvad man finder i patientprøver og modificerer dem, hvorved man inhiberer aktiviteten af komponenter i væsken, der destabiliserer PSA. I en foretrukken fremgangsmåde ifølge opfindelsen modificerer man sådanne biologiske væsker ved at skifte pH fra normal (ca. pH 7) til i det mindste ca. pH 9 i så lang tid at den destabiliserende aktivitet af komponenter i den biologiske væske effektivt hæmmes. Derefter sænkes pH i den biologiske væske til ca. pH 7.

Dette er et resumé af opfindelsen, så at den følgende detaljerede beskrivelse bedre kan forstås af fagmanden.

Som angivet ovenfor tilvejebringer opfindelsen et middel, hvorved naturligt baggrundsmateriale kan modificeres så prostata-specifikt antigen (PSA) kan stabiliseres deri. I denne sammenhæng vil betegnelsen "naturlig baggrundsmateriale" angive en biologisk forekommet komposition dannet ved livsprocesser, og hvori bindingskinetikken og den ikke specifikke bindingskarakteristik er den samme som, eller tilstrækkelig tilsvarende en patientprøve, så man kan benytte den som baggrundsmateriale. Opfindelsen er nyttig til påvisning og/eller kvantitativ måling af PSA i væskeformige prøver fra patienter ved hjælp af konventionelle immunassay-fremgangsmåder. Især er stabile naturlige baggrundsmaterialer fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendelige som materiale ved kalibrering og fortynding ved immunassays for PSA.

Immunassays, hvorved man bestemmer koncentrationen af antigener i væskeformige prøver, er velkendte og behøver ikke at beskrives i detaljer. Imidlertid er ved visse immunassays opfindelsen særlig
5 nyttig, og man kan nævne monoklone antistofbaserede immunometriske assays, såsom "two-site" eller "sandwich" immunometrisk assays beskrevet i US-patent 4.376.110. Derudover kan det nævnes, at sådanne immunassays kan gennemføres ved hjælp af midler valgt
10 blandt radiometriske, enzymatiske og fluorometriske midler.

Ifølge opfindelsen anvender man en biologisk væske fra et egnet pattedyr. F.eks. blod, serum, plasma, cerebro-spinalvæske eller urin kan anvendes
15 ifølge opfindelsen. Foretrukket er serum fra menneskeblod, i hvilket man ikke på påvise nogen som helst cirkulerende PSA i målelige koncentrationer. Især foretrukket er serum fra blod fra mennesker af hunkøn, da der her ikke findes cirkulerende PSA.

20 Ifølge en for tiden foretrukken fremgangsmåde ved opfindelsen modificerer man serum fra mennesker af hunkøn for at hæmme aktiviteten af serumkomponenter, som destabiliserer PSA, jvnfør krav 6. Ansøgeren ønsker ikke at bindes til nogen teori for instabiliteten af PSA i umodificeret serum, men man tror, at en sådan instabilitet
25 i det mindste delvis skyldes, at der findes cirkulerende protein, der binder prostata-antigen (PABG). Man har fundet PABG i betydelig forhøjede mængder i serum fra mænd med prostatacarcinomer, men man har også fundet, at det er tilstede i serum fra raske mænd og kvinder.
30 Chu et al., Annals NYAS, vol. 417, side 383-389, 1983.

Man udfører modificeringen af serum fra mennesker af hunkøn for at tilvejebringe et stabilt serum baseret baggrundsmateriale for PSA ved at ændre
35 pH i alkalisk retning til et pH på i det mindste ca. 9 i så lang tid, at aktiviteten af serumkomponenter, der destabiliserer PSA, effektivt hæmmes. Det fore-

trækkes at pH i serum forhøjet til ca. 12, serum
inkuberes i 5-45 minutter og derefter sænker man pH
i serum til ca. 7. Modifikationen af serum, hvorved
pH ændres ifølge opfindelsen, kan udføres ved hjælp af
5 kendte fremgangsmåder.

Fordelene ved stabile naturlige baggrunds-
materialer fremstillet ifølge opfindelsen i forhold
til syntetisk baggrundsmateriale ses i tabel 1.
Da den ikke specifikke bindingskarakteristik ved sådanne
10 stabile naturlige baggrundsmaterialer kan sammenlignes
med, hvad man finder i prøver fra patienter vil følsom-
heden og nøjagtigheden i et immunassay for PSA blive
forstærket.

Derudover vil stabiliteten af PSA i naturligt
15 baggrundsmateriale modificeret ifølge opfindelsen gøre
sådan baggrundsmateriale meget effektivt og anvendeligt
som kalibreringsmateriale eller som fortyndingsmiddel
i immunassays for PSA. Som vist i tabel II og III er
PSA betydelig mere stabilt i sådanne baggrundsmaterialer
20 end i ikke modificerede naturlige baggrundsmaterialer.

Opfindelsen forstås bedre ved hjælp af det
følgende eksempel.

Eksempel 1

25 Fremstilling af pH modificeret serum.

Serum fra mennesker af hunkøn, tilvejebragt fra
Interstate Blood Bank, Memphis, Tennessee og holdt ved
-20°C, blev benyttet til at fremstille et pH modificeret
naturligt baggrundsmateriale. I 1000 ml serum ind-
30 stillede man pH på ca. 12 ved at tilsætte 17-20 ml

10N NaOH i en beholder med omrører. Den basiske serumopløsning blev derefter inkuberet i 30 minutter ved 22-28°C under omrøring, hvorefter man vendte tilbage til pH ca. 7,0 ved at tilsætte 15-17 ml 10N HCl.

- 5 Man centrifugerede derefter denne opløsning med pH 7 i 10 minutter ved 1000 g og filtrerede gennem en sigte på 0,2 μ .

Alternativ metode til fremstilling af pH modificeret
10 serum.

- Ca. 0,30-0,50 ml 10N NaOH blev under omrøring sat til 20 ml serum fra forskellige mennesker af hunkøn, hvorved pH steg til 12,0. Det basiske serum blev inkuberet i 30 minutter, hvorefter man tilsatte 0,1M
15 natriumphosphat (0,276 g monobasisk natriumphosphat), under omrøring, herved faldt pH en smule. Man tilsatte derefter 0,40-0,60 ml 6N HCl for at fastsætte pH til 6, og opløsningen blev holdt under omrøring ved stuetemperatur i 2-3 timer. Endelig fastsatte man pH til 7
20 ved anvendelse af ca. 0,10-0,50 ml 1N NaOH.

Sammenligning af ikke specifik binding.

- Ikke specifikke bindingsværdier for prøver af syntetisk baggrundsmateriale, der indeholdt 5% serum
25 albumin fra køer (Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana)/2% IgG (Pel-Freeze Biologicals, Rogers, Arkansas), blev sammenlignet med prøver af ikke modificeret serum fra mennesker af hunkøn og prøver af pH modificeret serum fremstillet som beskrevet ovenfor,
30 hvorved de ikke specifikke bindingsværdier blev bestemt ved hjælp af et "two-site" immunradiometrisk assay, TANDEM-R PSA, som er i handelen fra Hybritech Incorporated, San Diego, California. Hvert baggrundsmateriale blev prøvet i 12 ens assays, hvor der blev
35 anvendt 0,05 ml per prøverør ifølge forskriften for TANDEM-R PSA med en forlænget inkubationsperiode på 4 timer.

I den følgende tabel I vises middelværdier for prøver med det syntetiske baggrundsmateriale for prøver med ikke modificeret serum og for prøver med pH modificeret serum. Data udtrykkes som impulser per minut og koncentration af PSA (ng/ml) i forhold til en standardkurve.

Tabel I			
	Baggrunds-	Impuls/	PSA (ng/ml)
10	materiale	minut	
	5% BSA/2% IgG	1179	0,24
	Ikke modificeret		
	serum	930	0,07
	pH modificeret		
15	serum	946	0,09

Det ses fra tabel I, at de ikke specifikke bindingsværdier for ikke modificeret og pH modificeret serum er sammenlignelige, mens værdierne for den ikke specifikke binding for de syntetiske prøver lå betydelig højere.

Bestemmelse af stabiliteten af PSA.

En accelereret stabilitetsundersøgelse af PSA blev udført under anvendelse af ikke modificeret serum fra menneske af hunkøn, og pH modificeret serum fremstilles som vist ovenfor. Man fortyndede 10 µl 855 ng/ml PSA fra sædplasma med 990 µl af hver prøve af baggrundsmateriale og opretholdt det ved 35°C.

Man bestemte stabiliteten af PSA, vist i tabel II som procenttab af målelig PSA, for hver prøve efter 1, 3 5 dage i forhold til en kontrolprøve opbevaret ved -70°C. Ved velkendte fremgangsmåder kan man extrapolere de målte værdier til 1,2, 3,6 og 6,0 måneder og til 4°C.

8

Tabel II

Baggrundsmateriale Procenttab af målelig PSA

Dage ved 35°C

	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>5</u>
5 Ikke modificeret	21	32	36
pH 12 modificeret	4	3	0
Ikke modificeret	20	26	30
pH 12 modificeret	8	7	5

10

Det ses tydeligt fra tabel, II at PSA var betydelig mere stabilt i pH modificeret serum end i ikke modificeret serum.

- Man bestemte tabet af måleligt PSA fra enten
- 15 plasma fra sæd eller fra serum fra mennesker af hankøn efter fortynding med ubehandlet serum eller serum modificeret som ovenfor beskrevet. Til fire rør, der indeholdt 0,4 ml prøve af baggrundsmateriale, satte man 0,1 ml 125 ng/ml PSA fra plasma fra sæd, hvorved man
- 20 opnåede en forventet koncentration på 25 ng/ml PSA. Lige store mængder af hver opløsning blev derefter fortyndet 1:1 med serum fra menneske af hankøn, som man tidligere analyserede og som indeholdt 19,1 ng/ml PSA. Hver af de 4 rør blev undersøgt for PSA indhold ved
- 25 hjælp af et "two-site" immunoradiometrisk assay, TANDEM-R PSA, (kan fås hos Hybritech Incorporated, San Diego, Californien) med en forlænget inkubations-tid på 4 timer. Slutkoncentrationerne og beregnet procenttab af PSA vises i tabel III. Data viser klart
- 30 at PSA i høj grad genfindes når man benytter det pH modificerede baggrundsmateriale, mens der forekommer et kraftigt tab af PSA ved benyttelse af ikke modificeret serum.

35

Tabel III

Tilsætning af PSA fra plasma fra sæd.

		PSA teoretisk	PSA observeret	PSA
		ng/ml	ng/ml	procenttab
5	Ikke modifi-			
	ceret serum	25,0	12,33	51
	pH modificeret	25,0	24,16	3
	serum			

10

Opløsninger fortyndet 1:1 med humant
serum, der indeholder PSA.

		PSA teoretisk	PSA observeret	PSA
		ng/ml	ng/ml	procenttab
15	Ikke modifi-			
	ceret serum	15,72	15,29	3
	pH modificeret	21,63	22,17	0
20	serum			

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en stabil biologisk væske til anvendelse som baggrundmateriale ved målingen af prostata-specifikt antigen (PSA) i en væskeformig
5 prøve ved hjælp af et immunassay, k e n d e t e g n e t ved, at man modificerer en biologisk bærervæske indeholdende PSA fra et egnet pattedyr ved at væskens pH hæves og derefter holdes konstant i et passende tidsrum, hvorefter pH ændres til den oprindelige værdi.
- 10 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den biologiske væske udvælges blandt blod, serum eller plasma.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at pattedyret er et menneske.
- 15 4. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at pattedyret er et menneske af hunkøn.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at modificeringen omfatter, at man bringer pH af den biologiske væske op på en værdi af mindst ca.
20 9, fortrinsvis til en værdi af ca. 12 i så lang tid, at den destabiliserende aktivitet af komponenter i den biologiske væske effektivt hæmmes, og derefter sænker pH i den biologiske væske til en værdi på ca. 7.
6. Fremgangsmåde til stabilisering af prostata-specifikt antigen i et serumbaseret baggrundsmateriale til
25 brug for måling af nævnte PSA i en væskeformig prøve ved hjælp af et immunassay, k e n d e t e g n e t ved, at man modificerer nævnte serum fra et menneske af hunkøn ved at væskens pH hæves og derefter holdes konstant i et passende
30 tidsrum, hvorefter pH ændres til den oprindelige værdi.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at modificeringen omfatter, at man bringer pH af serum op på en værdi af mindst ca. 9, fortrinsvis til en værdi af ca. 12, i så lang tid, at den destabiliserende aktivitet af serumkomponenterne effektivt hæmmes, og derefter
35 sænker pH i serum til en værdi på ca. 7.
8. Anvendelse af den stabile biologiske væske frem-

stillet ifølge krav 1 eller 2, eller af det serumbaserede baggrundsmateriale indeholdende PSA stabiliseret ifølge krav 6 som materiale ved kalibrering.

5 9. Anvendelse af den stabile biologiske væske fremstillet ifølge krav 1 eller 2, eller af det serumbaserede baggrundsmateriale indeholdende PSA stabiliseret ifølge krav 6 som fortyndingsmiddel.

10 10. Anvendelse af den stabile biologiske væske fremstillet ifølge krav 1 eller 2 i et immunassay baseret på monoklonalt antistof.

11. Anvendelse ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at immunassayet er et såkaldt "two-site" immunassay.

15 12. Anvendelse ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at immunassayet gennemføres ved hjælp af midler udvalgt blandt radiometriske, enzymatiske og fluorometriske midler.