(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 31 999 T2** 2005.06.23

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 818 680 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 999.7**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 111 863.3**
(96) Europäischer Anmeldetag: **11.07.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.01.1998**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.12.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.06.2005**

(51) Int Cl.[7]: **G01N 33/546**

(30) Unionspriorität:
18327996 12.07.1996 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:
Daiichi Pure Chemicals Co. Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Wächtershäuser, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 80333 München

(72) Erfinder:
Saitoh, Kazunori, Ryugasaki-shi, Ibaraki, JP;
Manabe, Mitsuhisa, Ryugasaki-shi, Ibaraki, JP

(54) Bezeichnung: **Agglutinations-Immunotest**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Antigens in einer Testprobe, und insbesondere einen Immunoassay, der eine Agglutination durch eine Zweistufen-Reaktion unter Verwendung eines unlöslichen Trägers verwendet, eine hohe Spezifität aufweist und einfach und mit niedrigen Kosten durchzuführen ist.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Als Immunoassays auf der Basis einer Antigen-Antikörper-Reaktion waren bisher Assays bekannt, die eine Agglutinationsreaktion verwenden, und Assays, die einen mit einem Enzym markierten Antikörper zur Bestimmung verwenden. In diesen Immunoassays wird die Menge eines durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion gebildeten Immun-Komplexes entweder visuell oder als optische Veränderung bestimmt. Eine Methode (nachstehend als "Agglutinationsmethode" bezeichnet) zur Bestimmung eines Antigens in einer Testprobe, die eine Agglutinationsreaktion oder Agglutinationsinhibierungsreaktion auf der Basis einer Antigen-Antikörper-Reaktion von unlöslich gemachten Teilchen (nachstehend als "immobilisierter Antikörper" bezeichnet), durch Festhalten eines Antikörpers an einem unlöslichen Träger mit einem auf den Antikörper ansprechenden Antigen erhalten, verwendet, erlaubt eine Automatisierung der Bestimmung und wird somit bei automatischen Analysengeräten und weit verbreitet verwendet.

[0003] Viele der bisher verwendeten Agglutinationsmethoden verwenden Latexteilchen als unlöslichen Träger, und es ist bekannt, einen immobilisierten Antikörper unter Verwendung (1) eines polyklonalen Antikörpers, (2) einer Art eines monoklonalen Antikörpers oder (3) von zwei Arten von monoklonalen Antikörpern mit einem Zielantigen in einer Testprobe reagieren zu lassen, um ein Immunaggregat zu bilden, und den Grad der Agglutination entweder visuell oder optisch zu bestimmen. Daneben ist auch (4) ein Verfahren bekannt, in dem ein Zielantigen in einer Testprobe auf einem unlöslichen Träger adsorbiert oder gebunden wird, und dann eine Reaktion mit einem gegenüber dem Antigen empfindlichen Antikörper durchgeführt wird, um den unlöslichen Träger selektiv zu agglutinieren (japanische offengelegte Patentanmeldung Nr. 35752/1995).

[0004] Die vorstehend beschriebenen konventionellen Methoden besitzen jedoch die folgenden Nachteile. Die Methode (1) ist die am häufigsten verwendete Methode, weist aber die Probleme auf, dass der polyklonale Antikörper mit fremden Antikörpern, die von einer Spurenmenge von Fremdkomponenten, die in einem zur Antikörperbildung verwendeten Antigen enthalten sind, abgeleitet sind, und mit anderen Komponenten mit einer zum Zielantigen ähnlichen Struktur kreuzreagiert, weil die Spezifität eines Assaysystems durch die Spezifität des verwendeten polyklonalen Antikörpers beeinflusst wird. Die Methode (2) kann nur für spezielle Antigene verwendet werden, in denen eine Vielzahl von Bereichen (nachstehend als "Erkennungsbereiche" ("recognition sites") bezeichnet) vorhanden sind, die an der Antigen-Antikörper-Reaktion teilnehmen, weil nur eine Art eines monoklonalen Antikörpers verwendet wird. Nach der Methode (3) wird ein Immunagglutinat durch Erhöhen der Zahl der Erkennungsstellen auf eine Zahl, die der Zahl von Antikörpern entspricht, unter Verwendung von zwei Arten monoklonaler Antikörper gebildet. Es kann jedoch nicht eine Kombination von irgendwelchen zwei Arten von Antikörpern verwendet werden, die gegenüber dem gleichen Antigen empfindlich sind, sondern es besteht das Problem, dass eine Kombination von zwei speziellen Arten von Antikörpern entsprechend einem Zielobjekt ausgewählt werden muss. Die Methode (4) weist das Problem auf, dass der unlösliche Träger an einem Reaktor eines automatischen Analysengeräts nicht spezifisch adsorbiert wird, wodurch der Reaktor kontaminiert wird.

[0005] Es gibt auch eine Methode, in der ein immobilisierter Antikörper und ein freier Antikörper verwendet werden (japanische Patentveröffentlichung Nr. 31227/1991). Diese Methode umfasst jedoch ein Reaktionssystem, in dem der immobilisierte Antikörper mit einem zu bestimmenden Zielobjekt unter Bildung eines optisch messbaren Immunagglutinats reagiert, was verursacht, dass beide Antikörper (der freie Antikörper und der immobilisierte Antikörper), um das zu bestimmende Zielobjekt konkurrieren, wodurch das Auftreten einer Immunagglutination zur Vergrößerung eines Messbereichs inhibiert wird. Diese Methode ist deshalb sowohl im Prinzip als auch in der Aufgabenstellung von der vorliegenden Erfindung verschieden, in der zwei in der Form von einander verschiedene Antikörper verwendet werden, um eine Immunagglutination zu verursachen und zu verstärken.

[0006] Die EP 0 617 285 beschreibt einen Immunoassay, bei dem man einen ersten Antikörper, der an Trägerteilchen immobilisiert ist, mit dem Antigen in einer Probe reagieren lässt. Dann lässt man einen zweiten Antikörper, der gegen ein zweites Epitop des Antigens gerichtet ist, und an zweiten Trägerteilchen immobilisiert ist, reagieren. Um den sogenannten "Hook-Effekt" zu vermeiden, wird ein dritter freier Antikörper, der einen Bereich, der von dem von den zwei ersten Antikörpern erkannten Bereich verschieden ist, zur Probe zugegeben, und der Grad der Veränderung in der Agglutination bestimmt. Die EP 0

617 285 beschreibt also eine Ausführungsform, bei der nur ein Antikörper, der an Trägerteilchen immobilisiert ist, notwendig ist, um die Agglutinationsreaktion durchzuführen, vorausgesetzt, dass das Antigen mindestens zwei identische Epitope für diesen Antikörper besitzt. Ein freier Antikörper, der ein anderes Epitop auf diesem Antigen erkennt, wird zugegeben, um den Hook-Effekt zu vermeiden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung wurde im Hinblick auf die vorstehend beschriebenen Probleme gemacht, und ihre Aufgabenstellung ist die Bereitstellung eines Immunoassays, der eine Agglutination eines immobilisierten Antikörpers mit einem zu bestimmenden Zielobjekt verwendet, und eine hohe Spezifität aufweist.

[0008] Im Hinblick auf den vorstehend genannten Sachverhalt haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung umfangreiche Untersuchungen durchgeführt. Als Ergebnis wurde gefunden, dass durch zwei Arten von Antikörpern, die verschiedene Bereiche eines zu bestimmenden Zielantigens erkennen, verwendet werden und hintereinander in einem Zustand reagieren gelassen werden, in dem einer von ihnen immobilisiert ist, und der andere frei ist, wodurch ein Immunoassay ermöglicht wird, der eine hohe Spezifität aufweist, und einfach und mit geringen Kosten durchzuführen ist, was zur Vervollständigung der vorliegenden Erfindung führte.

[0009] Erfindungsgemäß wird somit ein Immunoassay bereitgestellt, umfassend: Reagieren lassen eines immobilisierten Antikörpers, erhalten durch Binden eines Antikörpers, der einen Bereich auf einem zu bestimmenden Zielantigen erkennt, an unlösliche Trägerteilchen, mit einem Antigen in einer Testprobe, dann Reagieren lassen eines freien Antikörpers, der einen Antigenbereich erkennt, der von dem durch den immobilisierten Antikörper erkannten Bereich verschieden ist, mit dem Antigen, und optisches Bestimmen des Grades einer Veränderung in der durch die Reaktion aufgetretenen Agglutination, wobei das Antigen, der erste Antikörper und der zweite Antikörper die Bedingung erfüllen, dass

(i) eine Veränderung einer Agglutination nicht beobachtet wird, wenn das Antigen mit dem ersten Antikörper in Abwesenheit des zweiten Antikörpers Reagieren gelassen wird;
(ii) eine Veränderung in der Agglutination nicht beobachtet wird, wenn das Antigen mit dem zweiten Antikörper in Abwesenheit des ersten Antikörpers Reagieren gelassen wird; und
(iii) eine Veränderung in der Agglutination beobachtet wird, wenn das Antigen sowohl mit dem ersten Antikörper als auch dem zweiten Antikörper Reagieren gelassen wird.

[0010] Erfindungsgemäß wird auch ein Immunoassay bereitgestellt, umfassend: Reagieren lassen eines freien Antikörpers, der einen Bereich auf einem zu bestimmenden Zielantigen erkennt, mit einem Antigen in einer Testprobe, dann Reagieren lassen eines immobilisierten Antikörpers, erhalten durch Binden eines Antikörpers, der einen Antigenbereich erkennt, der von dem durch den freien Antikörper erkannten Bereich verschieden ist, an unlösliche Trägerteilchen, mit dem Antigen, und optisches Bestimmen des Grades einer Veränderung in der durch die Reaktion verursachten Agglutination, wobei das Antigen, der erste Antikörper und der zweite Antikörper die Bedingung erfüllen, dass

(i) eine Veränderung einer Agglutination nicht beobachtet wird, wenn das Antigen mit dem ersten Antikörper in Abwesenheit des zweiten Antikörpers Reagieren gelassen wird;
(ii) eine Veränderung in der Agglutination nicht beobachtet wird, wenn das Antigen mit dem zweiten Antikörper in Abwesenheit des ersten Antikörpers Reagieren gelassen wird; und
(iii) eine Veränderung in der Agglutination beobachtet wird, wenn das Antigen sowohl mit dem ersten Antikörper als auch dem zweiten Antikörper Reagieren gelassen wird.

[0011] Die Immunoassays gemäß der vorliegenden Erfindung haben den Vorteil, dass sie eine hohe Spezifität aufweisen und einfach und mit niedrigen Kosten durchzuführen sind, und im Hinblick auf die verwendeten Antikörper, weil einer vom immobilisierten Antikörper und freien Antikörper eine hohe Spezifität für das zu bestimmende Zielantigen aufweist, und der andere Antikörper keine vollkommene Spezifität aufweisen muss und etwas Kreuzreaktivität aufweisen kann.

[0012] Die vorstehenden und andere Aufgabenstellungen, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung sind aus den bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, die nachfolgend detailliert unter Bezugnahme auf die anliegenden Zeichnungen beschrieben werden, leicht erkennbar.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] Fig. 1 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem spektralen Absorptionsmaß und der Konzentration von Apoprotein B bei der erfindungsgemäßen Prüfung auf Apoprotein B.

[0014] Fig. 2 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem spektralen Absorptionsmaß und der Konzentration eines Serum-Amyloid A-Proteins (SAA) bei der erfindungsgemäßen Prüfung auf SAA.

[0015] Fig. 3 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem spektralen Absorptionsmaß und der Konzentration eines Thrombin-Antithrombin-Komple-

xes (TAT) bei der erfindungsgemäßen Prüfung auf TAT.

[0016] Fig. 4 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem spektralen Absorptionsmaß und der Konzentration eines Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT) bei der erfindungsgemäßen Prüfung auf TAT.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG BEVORZUGTER AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0017] Als zur praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung geeignete unlösliche Trägerteilchen kann ohne Beschränkung irgendeine bekannte Substanz, die bisher zur Prüfung auf ein Antigen oder einen Antikörper unter Verwendung eines unlöslichen Trägers verwendet wurde, verwendet werden. Beispiele dafür umfassen organische polymere Substanzen, anorganische Substanzen, Zellmembranen, Hämozyten und Mikroorganismen. Bevorzugte Beispiele der organischen polymeren Substanzen umfassen Latexteilchen, erhalten durch gleichförmiges Suspendieren eines feinen Pulvers von Acrylsäurepolymer, Styrolpolymer, Methacrylsäurepolymer oder dergleichen. Beispiele der anorganischen Substanzen umfassen feine Teilchen aus Siliciumdioxid, Aluminiumoxid und dergleichen. Im Hinblick auf die Teilchengröße der unlöslichen Trägerteilchen besteht auch keine besondere Beschränkung. Die Trägerteilchen haben jedoch bevorzugt eine mittlere Teilchengrößer von im allgemeinen 0,05 bis 1 µm, insbesondere von 0,05 bis 0,5 µm. Es besteht außerdem keine besondere Beschränkung im Hinblick auf die Methode der Immobilisierung des Antikörpers an einem solchen unlöslichen Träger, und Beispiele dafür umfassen eine physikalische Adsorption, ein kohärentes Binden, ein immunologisches Binden und ein magnetisches Binden.

[0018] Keine besondere Beschränkung besteht im Hinblick auf die Flüssigkeit, in der der immobilisierte Antikörper suspendiert wird. Im allgemeinen wird jedoch eine Pufferlösung, z. B. ein Phosphatpuffer, Glycinpuffer, Tris-Puffer oder Good-Puffer verwendet. Der pH-Wert der Reaktion beträgt vorzugsweise 5 bis 10, insbesondere 6 bis 9. Keine besondere Beschränkung besteht im Hinblick auf die Konzentration des immobilisierten Antikörpers im endgültig hergestellten Reagens. Der immobilisierte Antikörper liegt jedoch in der Suspension vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1 bis 10 mg/ml vor.

[0019] Die Formen der erfindungsgemäß verwendeten Antikörper sind zwei Formen, nämlich die eines immobilisierten Antikörpers und eines freien Antikörpers. Diese Antikörper können entweder monoklonale Antikörper oder polyklonale Antikörper sein, sofern sie verschiedene Bereiche an einem zu bestimmenden Zielantigen erkennen. Von den erfindungsgemäß verwendeten Antikörpern weist einer vom immobilisierten Antikörper und freien Antikörper eine hohe Spezifität für das Zielobjekt auf, und der andere Antikörper muss keine strikte Spezifität aufweisen und kann etwas Kreuzreaktivität aufweisen. Die Antikörper können entweder allein oder in Kombination verwendet werden, sofern sie die vorstehend angegebenen Bedingungen erfüllen.

[0020] Im Hinblick auf das erfindungsgemäß zu bestimmende Zielantigen besteht keine besondere Beschränkung. Beispiele hierfür umfassen Hormone (Insulin, HCG-β, Wachstumshormon, TSH, LH, FSH, Prolactin, Thyroxin, Triiodthyronin, Gastrin, Giucagon, Somatostatin und dergleichen), Enzyme (Elastase, Amylase, Protease, Lipase, Ribonuclease, Enolase, alkalische Phosphatase und dergleichen), Serumproteine (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, RF, SAA, SLO, Makroglobulin, TBG, Glykoprotein, Glykolipid, Apoproteine AI, AII, B, CI, CII, CIII, D, E und F und dergleichen), Gerinnungs-fibrinolytische Faktoren (clotting-fibrinolytic factors) (TAT, PIC, ATIII, APL und dergleichen), HbA_1C, Tumor-assoziierte Antigene (CEA, α-Fetoprotein, Ferritin, POA, CA19-9, CA125 und dergleichen), DNA-bindende Proteinfaktoren, Cytokine (Interferon, Interleukin-1, Interleukin-2 und dergleichen), verschiedene Bakterien, Viren und Protozoen (Fungi, Streptococci, Hepatitisviren, Herpesviren, AIDS-Viren, Toxoplasma gondii, Malaria-Parasiten, Entamoeba histolytica und dergleichen).

[0021] Nach dem erfindungsgemäßen Immunoassay wird die Bestimmung des Antigens in einer Testprobe z. B. auf folgende Weise durchgeführt. Ein Agglutinat wird ausgebildet durch eine Zweistufen-Reaktion, in der das Antigen mit dem immobilisierten Antikörper reagieren gelassen wird, und dann der freie Antikörper reagieren gelassen wird, oder durch eine andere Zweistufen-Reaktion, in der das Antigen mit dem freien Antikörper reagieren gelassen wird, und dann der immobilisierte Antikörper reagieren gelassen wird. Die von der Menge des Agglutinats abhängige Verringerung des durchgelassenen Lichts kann mittels eines Spektrometers oder eines automatischen Analysengerätes bestimmt werden, um die Menge des Antigens in der Probe zu messen, indem man sie mit einer vorher ausgebildeten Eichkurve vergleicht, oder dergleichen.

[0022] Das Prinzip der erfindungsgemäßen Reaktion ist eine Zweistufen-Reaktion, bei der ein immobilisierter Antikörper oder freier Antikörper mit einem Zielantigen Reagieren gelassen wird, um das Antigen durch den Antikörper einzufangen, und ein bestimmbares Agglutinat wird durch den freien Antikörper oder immobilisierten Antikörper, der dazu fähig ist, mit dem so eingefangenen Antigen zu kuppeln, gebildet, wobei das Antigen, der erste Antikörper und der zweite Antikörper die Bedingungen erfüllen, dass

(i) eine Veränderung einer Agglutination nicht be-

obachtet wird, wenn das Antigen mit dem ersten Antikörper in Abwesenheit des zweiten Antikörpers Reagieren gelassen wird;
(ii) eine Veränderung in der Agglutination nicht beobachtet wird, wenn das Antigen mit dem zweiten Antikörper in Abwesenheit des ersten Antikörpers Reagieren gelassen wird; und
(iii) eine Veränderung in der Agglutination beobachtet wird, wenn das Antigen sowohl mit dem ersten Antikörper als auch dem zweiten Antikörper Reagieren gelassen wird. Der erfindungsgemäße Immunoassay ist deshalb im Reaktionsmechanismus verschieden vom konventionellen Agglutinations-Immunoassay, in dem immunisierte Antikörpermoleküle in einer Stufe durch ein Zielantigen agglutiniert werden, um ein optisch bestimmbares Agglutinat auszubilden. Der erfindungsgemäße Immunoassay unterscheidet sich außerdem stark von einer Immunoturbidimetrie, bei der eine Antigen-Antikörper-Reaktion in Gegenwart einer die Immunreaktion beschleunigenden Komponente, wie z. B. Polyethylenglykol 6000, durchgeführt wird, um den Grad der Immunagglutination zu bestimmen, bei dem keine die Immunreaktion beschleunigende Komponente erforderlich ist, und der immobilisierte Antikörper verwendet wird.

[0023] Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend detaillierter durch die folgenden Beispiele beschrieben. Die vorliegende Erfindung ist jedoch keinesfalls auf diese Beispiele beschränkt.

Beispiel 1: Assay von Apoprotein B

(1) Herstellung einer Suspension von an Teilchen immobilisiertem Anti-Apoprotein B-Antikörper

[0024] Zu 5 ml einer durch Mischen eines Anti-Apoprotein B-monoklonalen Antikörpers bei einer Konzentration von 1,4 mg/ml mit einem 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4) erhaltenen Lösung wurden 5 ml einer 2%-Suspension eines Polystyrollatex (Produkt von Sekisui Chemical Co., Ltd.) mit einer mittleren Teilchengröße von 0,2 µm zugegeben und dann bei 4°C 2 Stunden lang gerührt. Ein 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4), der 2% Rinderserumalbumin enthielt, wurde dann zugefügt, und die resultierende Mischung über Nacht bei 4°C gerührt, um eine Suspension eines an Teilchen immobilisierten Anti-Apoprotein B-Antikörpers herzustellen.

(2) Herstellung einer Lösung eines freien Anti-Apoprotein B-Antikörpers

[0025] Ein Anti-Apoprotein B-polyklonaler Antikörper wurde bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml mit einem 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4) gemischt, um eine Lösung eines freien Anti-Apoprotein B-Antikörpers herzustellen.

(3) Assay von Apoprotein B

[0026] Nach Zugeben von 5 µl der Apoprotein-B-enthaltenden Probenlösung zu 200 µl der Suspension von an Teilchen immobilisiertem Anti-Apoprotein B-Antikörper unter Erwärmen der resultierenden Mischung auf 37°C während 5 Minuten wurden 200 µl der Lösung des freien Anti-Apoprotein B-Antikörpers zugegeben, wodurch der Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß bei einer Wellenlänge von 600 nm 1 Minute bis 5 Minuten nach Rühren der Mischung bestimmt wurde. Der so erhaltene Zusammenhang zwischen dem spektralen Absorptionsmaß und der Konzentration des Apoprotein B ist in Fig. 1 veranschaulicht.

Vergleichsbeispiel 1-1

[0027] Ein Assay auf Apoprotein B wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 1 (3) durchgeführt, mit der Ausnahme, dass 200 µl eines 0,05 M-Glycin-Puffers anstelle der Suspension von an Teilchen immobilisiertem Anti-Apoprotein B-Antikörper verwendet wurden. Der so erhaltene Grad der Veränderung im Absorptionsmaß ist in Fig. 1 veranschaulicht.

Vergleichsbeispiel 1-2

[0028] Ein Assay auf Apoprotein B wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 1 (3) durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstelle der Lösung des freien Anti-Apoprotein B-Antikörpers 200 µl eines 0,05 M-Glycin-Puffers verwendet wurden. Der so erhaltene Grad der Veränderung im Absorptionsmaß ist in Fig. 1 veranschaulicht.

[0029] Aus Fig. 1 ist es ersichtlich, dass im Beispiel 1 von der Konzentration des Apoprotein B abhängige Veränderungen im spektralen Absorptionsmaß beobachtet wurden, während keine Veränderung in beiden Vergleichsbeispielen 1-1 und 1-2 erkennbar sind.

Beispiel 2: Assay auf Serum-Amyloid-A-Protein (SAA)

(1) Herstellung einer Suspension von an Teilchen immobilisiertem Anti-Amyloid-A-Protein-Antikörper

[0030] Zu 5 ml einer durch Mischen eines Anti-Amyloid-A-Protein-polyklonalen Antikörpers bei einer Konzentration von 2,8 mg/ml mit einem 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4) erhaltenen Lösung wurden 5 ml einer 2%-Suspension eines Polystyrollatex (Produkt von Sekisui Chemical Co., Ltd.) mit einer mittleren Teilchengröße von 0,2 µm zugegeben und dann bei 4°C 2 Stunden lang gerührt. Ein 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4), der 2% Rinderserumalbumin enthielt, wurde dann zugefügt, und die resultierende Mischung über Nacht bei 4°C gerührt, um eine Suspension eines an Teilchen immobilisierten Anti-Amyloid-A-Pro-

tein-Antikörpers herzustellen.

(2) Herstellung einer Lösung eines freien Antiserum-Amyloid-A-Protein-Antikörpers

[0031] Ein C-terminaler spezifischer Antiserum-Amyloid-A-Protein-polyklonaler Antikörper, hergestellt durch Immunisieren eines Kaninchens mit einem C-terminalen Anteil eines Serum-Amyloid-A-Proteins wurde bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml mit einem 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4) gemischt, um eine Lösung eines freien Antiserum-Amyloid-A-Protein-Antikörpers herzustellen.

(3) Assay auf ein Serum-Amyloid-A-Protein

[0032] Nach Zugeben von 4 µl einer Probenlösung, die ein Serum-Amyloid-A-Protein enthielt, zu 240 µl der Suspension von an Teilchen immobilisiertem Anti-Amyloid-A-Protein-Antikörper wurde die resultierende Mischung auf 37°C während 5 Minuten erwärmt, 80 µl der Lösung des freien Antiserum-Amyloid-A-Protein-Antikörpers zugegeben, wodurch der Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß bei einer Wellenlänge von 600 nm 1 Minute bis 5 Minuten nach Rühren der Mischung bestimmt wurde. Der so erhaltene Zusammenhang zwischen dem spektralen Absorptionsmaß und der Konzentration an Serum-Amyloid-A-Protein ist in Fig. 2 veranschaulicht.

Vergleichsbeispiel 2-1

[0033] Der Assay auf ein Serum-Amyloid-A-Protein wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 2 (3) durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstelle der Suspension des an Teilchen immobilisiertem Anti-Amyloid-A-Protein-Antikörpers 240 µl eines 0,05 M-Glycin-Puffers verwendet wurden. Der so erhaltene Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß ist in Fig. 2 veranschaulicht.

Vergleichsbeispiel 2-2

[0034] Der Assay auf ein Serum-Amyloid-A-Protein wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 2 (3) durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstelle der Lösung des freien Antiserum-Amyloid-A-Protein-Antikörpers 80 µl eines 0,05 M-Glycin-Puffers verwendet wurden. Der so erhaltene Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß ist in Fig. 2 veranschaulicht.

[0035] Aus Fig. 2 ist es ersichtlich, dass von der Konzentration des Serum-Amyloid-A-Proteins abhängige Veränderungen im spektralen Absorptionsmaß im Beispiel 2 beobachtet werden, während keine Veränderung in den Vergleichsbeispielen 2-1 und 2-2 erkennbar sind.

Beispiel 3: Assay auf Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)

(1) Herstellung einer Suspension eines an Teilchen immobilisiertem Anti-Thrombin-Antikörpers

[0036] Zu 5 ml einer durch Mischen eines Anti-Thrombin-monoklonalen Antikörpers bei einer Konzentration von 1,4 mg/ml mit einem 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4) erhaltenen Lösung wurden 5 ml einer 2%-Suspension eines Polystyrollatex (Produkt von Sekisui Chemical Co., Ltd.) mit einer mittleren Teilchengröße von 0,2 µm zugegeben und dann bei 4°C 2 Stunden lang gerührt. Ein 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4), der 2% Rinderserumalbumin enthielt, wurde dann zugefügt, und die resultierende Mischung über Nacht bei 4°C gerührt, um eine Suspension eines an Teilchen immobilisierten Anti-Thrombin-Antikörpers herzustellen.

(2) Herstellung einer Lösung eines freien Anti-Antithrombin III-Antikörpers

[0037] Ein Anti-Antithrombin III-monoklonaler Antikörper wurde bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml mit einem 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4) gemischt, um eine Lösung eines freien Anti-Antithrombin-Antikörpers herzustellen.

(3) Assay auf einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex

[0038] Nach Zugeben von 20 µl einer Probenlösung, die einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex enthielt, zu 200 µl der Suspension von an Teilchen immobilisiertem Anti-Thrombin-Antikörper und Erwärmen der resultierenden Mischung auf 37°C während 5 Minuten wurden 100 µl der Lösung des freien Anti-Antithrombin III-Antikörpers zugegeben, wodurch der Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß bei einer Wellenlänge von 600 nm 1 Minute bis 5 Minuten nach Rühren der Mischung bestimmt wurde. Der so erhaltene Zusammenhang zwischen dem spektralen Absorptionsmaß und der Konzentration des Thrombin-Antithrombin III-Komplexes ist in Fig. 3 veranschaulicht.

Vergleichsbeispiel 3-1

[0039] Der Assay auf einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 3 (3) beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstelle der Suspension von an Teilchen immobilisiertem Anti-Thrombin-Antikörper 200 µl eines 0,05 M-Glycin-Puffers verwendet wurden. Der so erhaltene Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß ist in Fig. 3 veranschaulicht.

Vergleichsbeispiel 3-2

[0040] Der Assay auf einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 3 (3) beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstelle der Lösung des freien Anti-Antithrombin III-Komplex-Antikörpers 100 µl eines 0,05 M-Glycin-Puffers verwendet wurden. Der so erhaltene Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß ist in Fig. 3 veranschaulicht.

[0041] Aus Fig. 3 ist es ersichtlich, dass von der Konzentration des Thrombin-Antithrombin III-Komplexes abhängige Veränderungen im spektralen Absorptionsmaß im Beispiel 3 beobachtet werden, während keine Veränderung in den Vergleichsbeispielen 3-1 und 3-2 erkennbar ist.

Beispiel 4: Assay auf Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)

(1) Herstellung einer Suspension eines an Teilchen immobilisiertem Anti-Thrombin-Antikörpers

[0042] Zu 5 ml einer durch Mischen eines Anti-Thrombin-monoklonalen Antikörpers bei einer Konzentration von 1,4 mg/ml mit einem 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4) erhaltenen Lösung wurden 5 ml einer 2%-Suspension eines Polystyrollatex (Produkt von Sekisui Chemical Co., Ltd.) mit einer mittleren Teilchengröße von 0,2 µm zugegeben und dann bei 4°C 2 Stunden lang gerührt. Ein 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4), der 2% Rinderserumalbumin enthielt, wurde dann zugefügt, und die resultierende Mischung über Nacht bei 4°C gerührt, um eine Suspension eines an Teilchen immobilisierten Anti-Thrombin-Antikörpers herzustellen.

(2) Herstellung einer Lösung eines freien Anti-Antithrombin III-Antikörpers

[0043] Ein Anti-Antithrombin III-monoklonaler Antikörper wurde bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml mit einem 0,05 M-Glycin-Puffer (pH: 8,4) gemischt, um eine Lösung eines freien Anti-Antithrombin-Antikörpers herzustellen.

(3) Assay auf einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex

[0044] Nach Zugeben von 20 µl einer Probenlösung, die einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex enthielt, zu 200 µl der Lösung von an Teilchen immobilisiertem Anti-Thrombin III-Antikörper und Erwärmen der resultierenden Mischung auf 37°C während 5 Minuten wurden 100 µl der Suspension des freien Anti-Antithrombin III-Antikörpers zugegeben, wodurch der Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß bei einer Wellenlänge von 600 nm 1 Minute bis 5 Minuten nach Rühren der Mischung bestimmt wurde. Der so erhaltene Zusammenhang zwischen dem spektralen Absorptionsmaß und der Konzentration des Thrombin-Antithrombin III-Komplexes ist in Fig. 4 veranschaulicht.

Vergleichsbeispiel 4-1

[0045] Der Assay auf einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 4 (3) beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstelle der Lösung des freien Anti-Thrombin III-Antikörpers 200 µl eines 0,05 M-Glycin-Puffers verwendet wurden. Der so erhaltene Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß ist in Fig. 4 veranschaulicht.

Vergleichsbeispiel 4-2

[0046] Der Assay auf einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 4 (3) beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass anstelle der Suspension des an Teilchen immobilisiertem Anti-Antithrombin-Antikörpers 100 µl eines 0,05 M-Glycin-Puffers verwendet wurden. Der so erhaltene Grad der Veränderung im spektralen Absorptionsmaß ist in Fig. 4 veranschaulicht.

[0047] Aus Fig. 4 ist es ersichtlich, dass von der Konzentration des Thrombin-Antithrombin III-Komplexes abhängige Veränderungen im spektralen Absorptionsmaß im Beispiel 4 beobachtet werden, während keine Veränderung in den Vergleichsbeispielen 4-1 und 4-2 erkennbar ist.

Patentansprüche

1. Immunoassay zur Bestimmung eines Antigens in einer Probe, umfassend:
(a) Reagieren lassen der Probe
(a-1) mit einem ersten Antikörper, der dazu fähig ist, einen ersten Bereich auf dem Antigen zum Einfangen des Antigens zu erkennen, und dann
(a-2) mit einem zweiten Antikörper, der dazu fähig ist, einen zweiten Bereich auf dem Antigen, der vom ersten Bereich verschieden ist, zu erkennen, und der dazu fähig ist, mit dem eingefangenen Antigen unter Bildung eines bestimmbaren Agglutinats zu reagieren,
worin entweder der erste Antikörper auf unlöslichen Trägerteilchen immobilisiert ist und der zweite Antikörper frei ist, oder der erste Antikörper frei ist und der zweite Antikörper auf unlöslichen Trägerteilchen immobilisiert ist, und nachfolgendem
(b) optischem Bestimmen des Grads einer Veränderung in der durch die Reaktion auftretenden Agglutination, wobei das Antigen, der erste Antikörper und der zweite Antikörper die Bedingung erfüllen, dass
(i) eine Veränderung in der Agglutination nicht beobachtet wird, wenn das Antigen mit dem ersten Anti-

körper in Abwesenheit des zweiten Antikörpers Reagieren gelassen wird;
(ii) eine Veränderung in der Agglutination nicht beobachtet wird, wenn das Antigen mit dem zweiten Antikörper in Abwesenheit des ersten Antikörpers Reagieren gelassen wird; und
(iii) eine Veränderung in der Agglutination beobachtet wird, wenn das Antigen sowohl mit dem ersten Antikörper als auch mit dem zweiten Antikörper Reagieren gelassen wird.

2. Immunoassay nach Anspruch 1, worin das optische Bestimmen das spektrophotometrische Messen einer abfallenden Lichtdurchlässigkeit aufgrund der Bildung des Agglutinats umfasst.

3. Immunoassay nach Anspruch 1, worin die Menge des Antigens in der Probe aus einer Eichkurve bestimmt wird.

4. Immunoassay nach Anspruch 1, worin die unlöslichen Trägerteilchen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus organischen polymeren Substanzen, anorganischen Substanzen, Zellmembranen, Hämozyten und Mikroorganismen.

5. Immunoassay nach Anspruch 1, worin die unlöslichen Trägerteilchen Latexteilchen sind.

6. Immunoassay nach Anspruch 1, worin die unlöslichen Trägerteilchen Siliciumdioxid oder Aluminiumoxid sind.

7. Immunoassay nach Anspruch 1, worin die unlöslichen Trägerteilchen eine mittlere Teilchengröße von 0,05 bis 1 µm aufweisen.

8. Immunoassay nach Anspruch 1, worin das Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Insulin, HCG-β, Wachstumshormon, TSH, LH, FSH, Prolactin, Thyroxin, Triiodthyronin, Gastrin, Glucagon, Somatostatin, Enzymen, Serumproteinen, Gerinnungs-fibrinolytischen Faktoren (clottingfibrinolytic factors), HbA_1C, Tumor-assoziierten Antigenen, DNA-bindenden Proteinfaktoren, Cytokinen, Bakterien, Viren und Protozoen.

9. Immunoassay nach Anspruch 1, worin einer vom immobilisierten Antikörper und freien Antikörper eine hohe Spezifität für das Antigen aufweist und der andere keine strikte Spezifität aufweist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

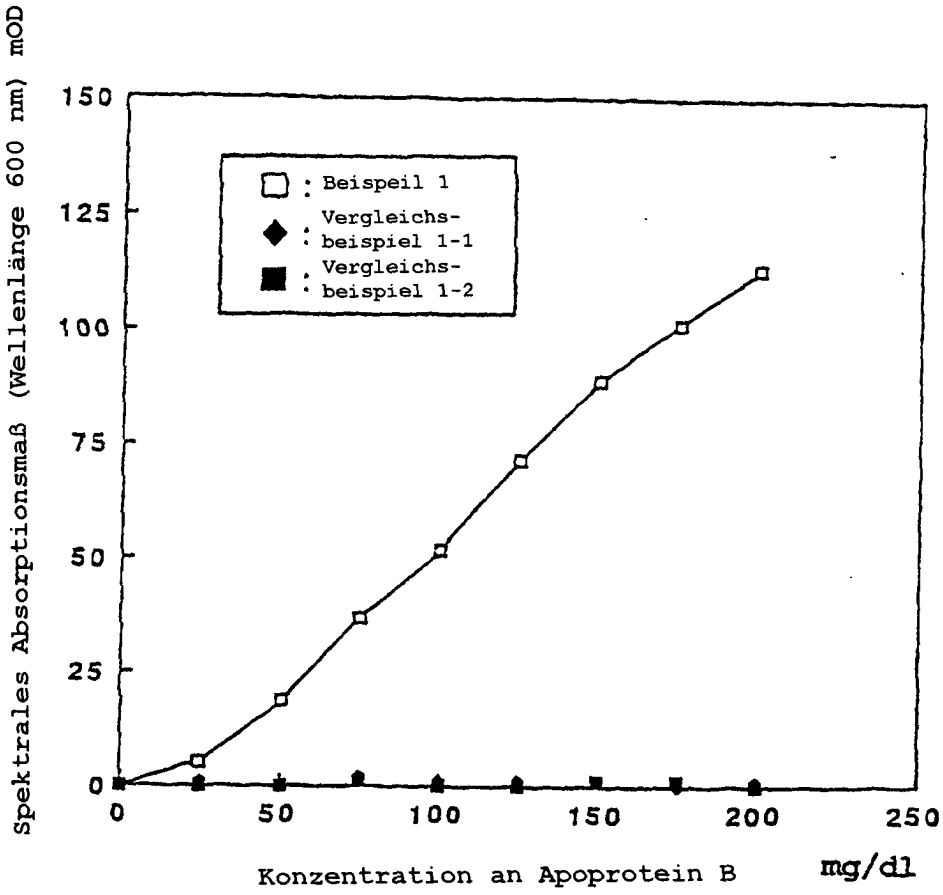


Fig. 2

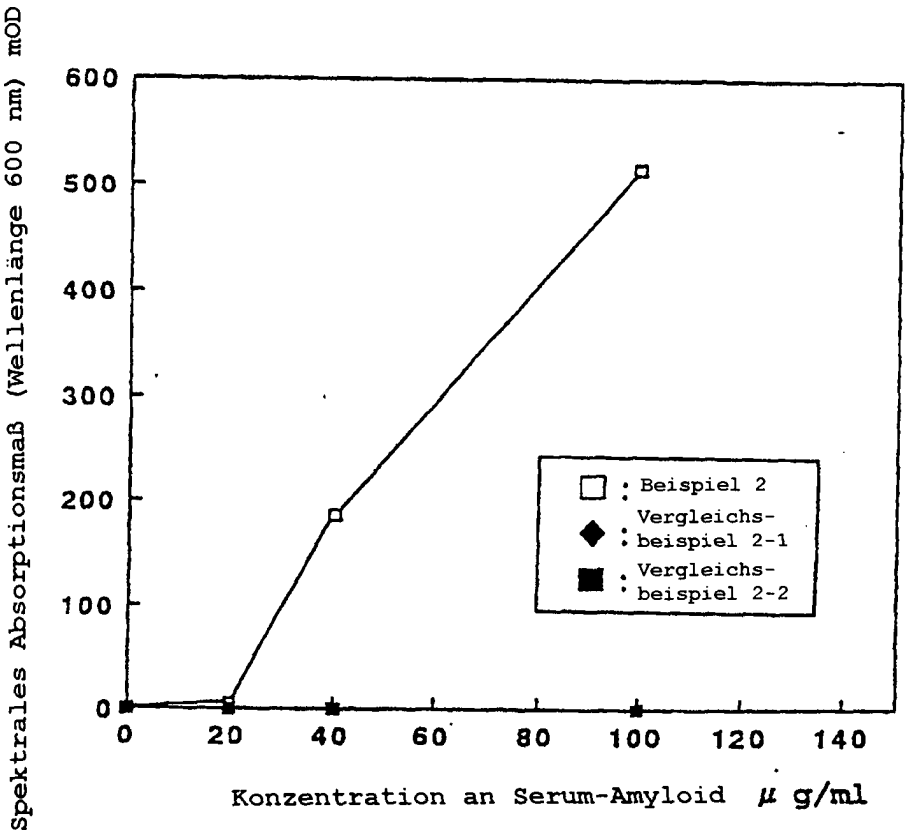

Spektrales Absorptionsmaß (Wellenlänge 600 nm) mOD
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Konzentration an Serum-Amyloid μ g/ml
: Beispiel 2
: Vergleichs-beispiel 2-1
: Vergleichs-beispiel 2-2

Fig. 3

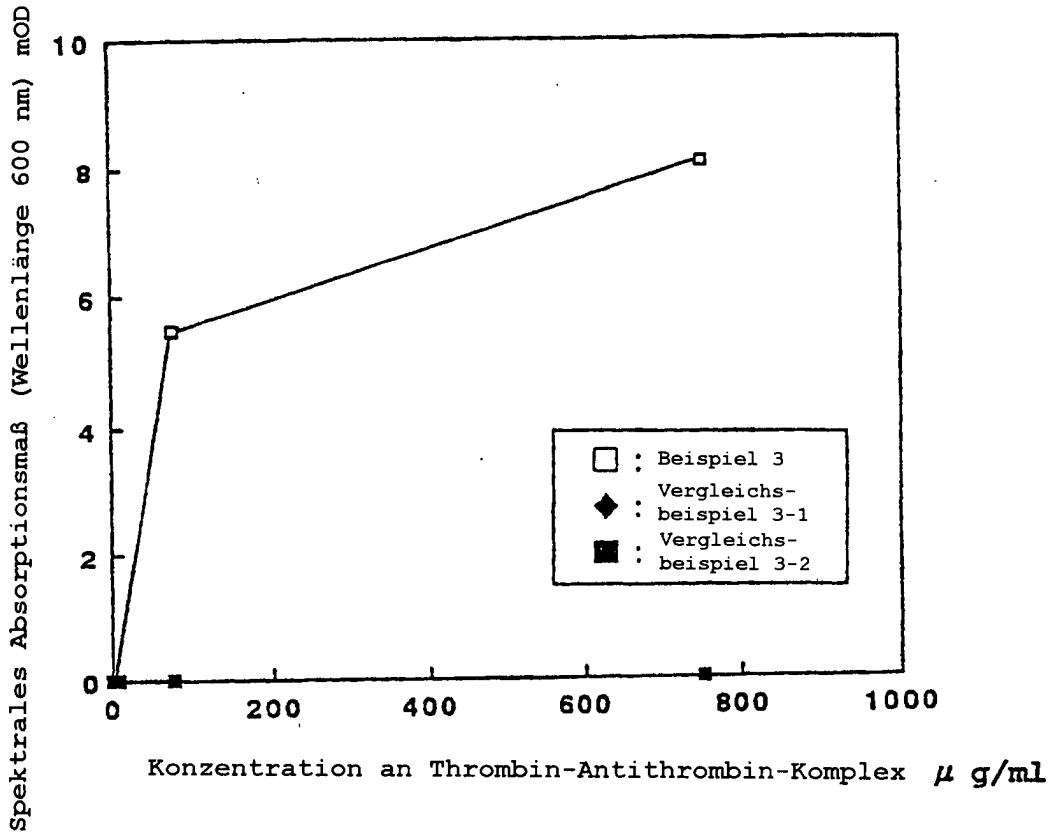
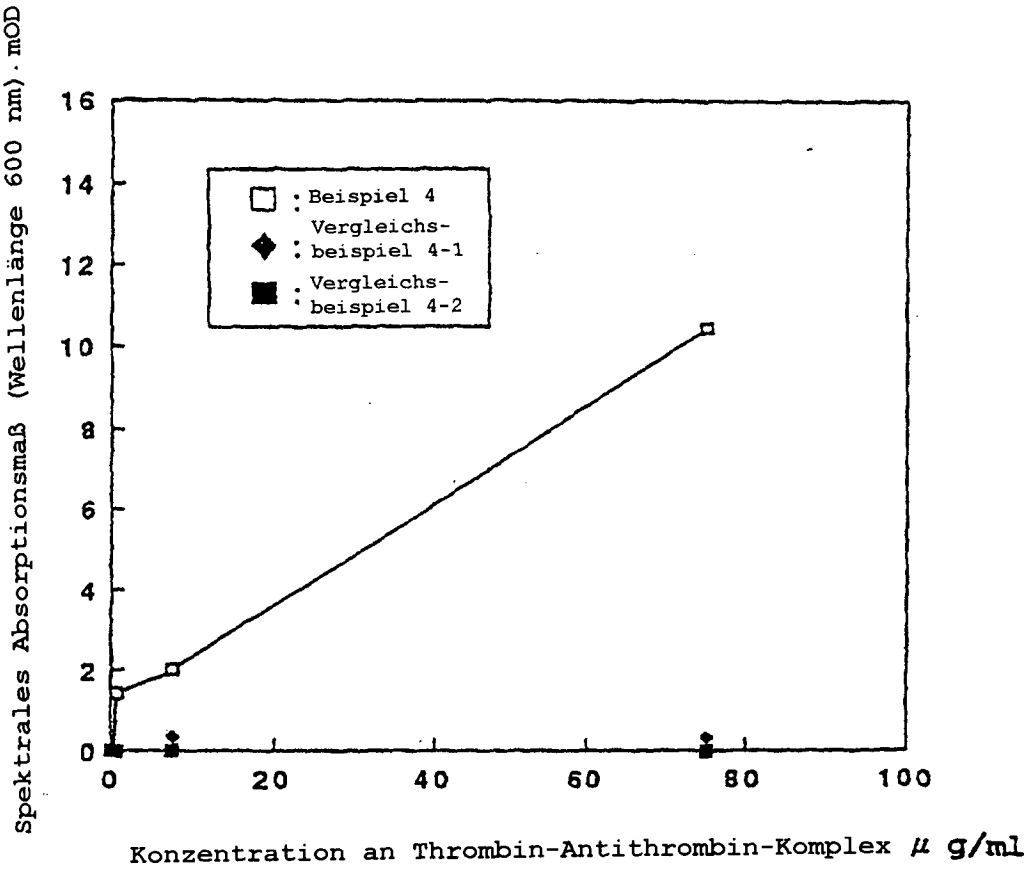

Spektrales Absorptionsmaß (Wellenlänge 600 nm) mOD
10
8
6
4
2
0
0
200
400
600
800
1000
Konzentration an Thrombin-Antithrombin-Komplex μ g/ml
: Beispiel 3
: Vergleichs-beispiel 3-1
: Vergleichs-beispiel 3-2

Fig. 4


Spektrales Absorptionsmaß (Wellenlänge 600 nm)·mOD
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
20
40
60
80
100
: Beispiel 4
: Vergleichs-beispiel 4-1
: Vergleichs-beispiel 4-2
Konzentration an Thrombin-Antithrombin-Komplex μ g/ml