

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Patent
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(12) **PATENT**SCHRIFT
(11) **DD 232 072** **B 5**

(51) Int. Cl.⁶: **G 01 N 33/60**
G 01 N 33/534

DEUTSCHES PATENTAMT

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

| | | | |
|-----------------------|------------------|---|--|
| (21) Aktenzeichen: | (22) Anmeldetag: | (44) Veröff.-tag der DD-Patentschrift: | (45) Veröff.-tag der Aufrechterhaltung: |
| DD G 01 N / 265 426 2 | 19. 07. 84 | 15. 01. 86 | 18. 04. 96 |

(30) Unionspriorität:
—

(72) Erfinder: Sarrach, Dieter, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.habil., 10315 Berlin, DE; Schreiber, Joachim,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 13125 Berlin, DE; Waldner, Helmut, 13125 Berlin, DE
(73) Patentinhaber: Bio Tez Berlin-Buch GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, DE

(54) Verfahren zur Bestimmung des freien oder gebundenen Aktivitätsanteils in Radioimmunoassays

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
„Versuche zum Einschluß von Insulin in Lecithin-Mikrovesikel unter Verwendung von ¹²⁵J-Insulin und ¹³¹J-Insulin als Indikatoren“, D. Sarrach, K. Lachmann, J. Zipper, J. Axt
„Isotopenpraxis“, 16. Jg., Heft 1/80, S. 13–16

„Modellmäßige Berechnung des Präzisionsprofils von Radioimmunoassays als Grundlage für die Ansatzoptimierung“, D. Sarrach, H. Schmidt, H. Waldner
„Isotopenpraxis“, Band 18, Heft 1/82, S. 19–22

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Bestimmung des freien oder gebundenen Aktivitätsanteils in mit ^{125}I arbeitenden Radioimmunoassays ohne deren vorherige Trennung, **dadurch gekennzeichnet**, daß in die Lösung, die sowohl den freien als auch den gebundenen Aktivitätsanteil enthält, eine feste oder kolloidale Schicht mit Szintillationseigenschaften, die gleichzeitig über Bindungskapazitäten entweder für den freien oder für den gebundenen Aktivitätsanteil besitzt, eingebracht und die an der Oberfläche dieser Schicht fixierte Aktivität gemessen wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Schicht Kunststoffolien mit Szintillatorsubstanzen eingebracht oder die Wandungen der Reaktionsgefäße mit Polystyren enthaltenden Szintillationslösungen beschichtet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß an der Oberfläche der Schicht Antikörper fixiert sind.
4. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Schicht für das Szintillationslicht optisch transparent ist.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Bestimmung des freien (B) oder des gebundenen (B) Aktivitätsanteils in Radioimmunoassays (RIA) ohne ihre vorherige Trennung, wenn als Radionuklid ^{125}I eingesetzt wird. Darüber hinaus ist das Verfahren zur selektiven Bestimmung desjenigen Anteils einer radioaktiven Substanz, der im Grenzbereich zwischen einer Lösung und einer festen oder kolloidalen Phase vorliegt, geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Das Prinzip der Radioimmunoassays und verwandter Methoden sowie seiner Varianten ist in der Monografie von T. CHARD: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, North Holland, Amsterdam 1978, dargelegt. Die selektive Reaktion der gesuchten Substanz mit einem spezifischen Bindungsmolekül (Antikörper oder dergl.) wird durch gleichzeitigen Einsatz einer konstanten Menge derselben Substanz in radioaktivmarkierter Form quantitativ erfaßbar, so daß die Konzentrationsabhängigkeit der Bindungsausbeute anhand einer Eichkurve zur empfindlichen analytischen Bestimmung der inaktiven Substanz genutzt werden kann.

Aufgrund seiner hohen spezifischen Aktivität wird überwiegend trägerfreies Iod-125 zur Herstellung der radioaktiv markierten Substanz verwendet, da nur so die vielfach erforderliche hohe Empfindlichkeit gesichert werden kann. In geringerem Umfang wird auch Tritium benutzt.

Aufgrund der weichen γ -Strahlung wird die ^{125}I -Aktivität am rationellsten im Bohrloch-Szintillationszähler gemessen. Jedoch ist eine Abtrennung des Komplexes der gesuchten Substanz mit dem Bindungsmolekül vom nichtgebundenen Anteil erforderlich, um den Aktivitätsanteil des Komplexes und damit die analytisch genutzte Reaktionsausbeute zu ermitteln. Im F-RIA wird das Bindungsmolekül physikalisch, z. B. adsorptiv (K. CATT und G. W. TREGGAR, Science **158**, 1570 [1967]), oder durch eine chemische Verknüpfung, wie sie aus der präparativen Chemie bekannt ist, an feste Substanzen gebunden. Dadurch wird die Trennoperation vereinfacht, z. B. erfolgt sie durch Abzentrifugieren eines den fixierten Antikörper enthaltenden gekörnten Trägermaterials oder durch Entleerung und Ausspülung von Teströhrchen, wenn das Bindungsmolekül an der Wandung fixiert ist. Trotz der gegenüber dem homogenen Reaktionssystem erzielten Vereinfachung bleibt eine Folge arbeitsaufwendiger und schlecht automatisierbarer Operationen bestehen.

Bei den bisher bekannten Verfahren für die Durchführung von RIA besteht somit die Notwendigkeit der Trennung von freier und gebundener Aktivität. Auch der Vorschlag, die Gammastrahlung des Überstandes durch eine spezielle Bleiabschirmung am Meßröhrchen zu messen (DE-OS 2 261 561), kann den Schritt der Zentrifugation nicht vermeiden und erfordert außerdem teure Spezialausführungen der Probenröhrchen. Der ebenfalls vorgeschlagene „Lidex-Mischer-Separator“ (DE-OS 3 225 043) soll der automatischen Phasentrennung ohne Zentrifugation dienen. Er erscheint jedoch kompliziert und für die Durchführung von Serienanalysen nur bedingt geeignet.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist die Einsparung des Verfahrensschrittes zur Trennung des freien und gebundenen Aktivitätsanteils in RIA.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit dem der freie oder der gebundene Anteil der Radioaktivität in RIA selektiv bestimmt werden kann, ohne sie vorher voneinander trennen zu müssen. Das erfindungsgemäße Verfahren besteht darin, daß in die Lösung, die sowohl den freien als auch den gebundenen Anteil des radioaktiven Indikators enthält, eine feste oder kolloidale Schicht mit Szintillationseigenschaften (im weiteren kurz

Szintillationsschicht genannt), die gleichzeitig über Bindungskapazitäten für den freien oder für den gebundenen radioaktiven Indikator besitzt, eingebracht und die Aktivität gemessen wird, die sich in der Grenzschicht zwischen der eingebrachten Szintillationsschicht und der Lösung einstellt. Die Zuordnung der gemessenen Aktivitäten zu den entsprechenden Konzentrationen erfolgt an Hand von Standards (Eichkurven). Im Gegensatz zu den herkömmlichen Ausführungen wird im Falle von ^{125}I die weiche Konversionselektronenstrahlung zur Messung ausgenutzt, die aufgrund ihrer Reichweite von etwa $10\ \mu\text{m}$ nur von in unmittelbarer Nähe der Szintillationsschicht lokalisierten ^{125}I -Atomen erfaßt wird, während alle in der Lösung emittierten Konversionselektronen die Szintillationsschicht nicht erreichen können, also eliminiert werden. Andererseits muß die Dicke der Szintillationsschicht so gering gewählt werden, daß die Gammastrahlung des ^{125}I möglichst keinen Meßeffect bewirkt.

Durch die Wahl des Bindungspartners an der Oberfläche der Szintillationsschicht wird entweder in freier oder in gebundener Form vorliegende Aktivität gebunden. Die dafür erforderlichen Bindungskapazitäten können nach den für Festphasen-RIA bekannten Methoden geschaffen werden (z. B. an der Oberfläche fixierte Antikörper).

Die Szintillationsschicht muß formstabil sein, um reproduzierbare Bedingungen für die Messungen zu schaffen (konstante Geometrieverhältnisse). Das kann erreicht werden, indem z. B. die Wandung der Reaktionsgefäße mit einer Polystyren enthaltenden Szintillatorlösung beschichtet wird oder handelsübliche oder selbst hergestellte Kunststoffolien mit Szintillatorsubstanzen in die Reaktionsgefäße eingebracht werden (auch hier ist auf Reproduzierbarkeit zu achten). Die Schicht sollte für das Szintillationslicht transparent sein. Zur Messung der austretenden Lichtimpulse kann ein übliches Flüssigkeitsszintillationsspektrometer unter Einschaltung des ^3H -Kanals dienen. Es konnte nachgewiesen werden, daß mit derartigen Anordnungen Meßeffectivitäten von 18 bis 34 %, bezogen auf die Zerfallsrate, erzielbar sind, während die Empfindlichkeiten für eine nur homogen verteilte Substanz, die aufgrund der Gammakomponente des ^{125}I ermittelt wird, um den Faktor 25 bis 125 niedriger lag.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist auf Radionuklide anwendbar, die eine schwache Konversionselektronenstrahlung besitzen. Sie ist aber auch anwendbar auf reine Betastrahler, wenn die Reichweite der Strahlung im Bereich der sich ausbildenden Grenzschicht liegt. Im letzteren Fall kann die Dicke der Szintillationsschicht größer sein, da keine reichweitige Strahlung vorhanden ist.

Die Erfindung ermöglicht somit die direkte selektive Bestimmung des freien oder gebundenen Anteils der Indikatoraktivität ohne weitere Trennoperation. Darüber hinaus können auch statische und kinetische Analysen von Adsorption- und Bindungsvorgängen im Bereich der Grenzfläche vorgenommen werden.

Ausführungsbeispiel

- Zur Ermittlung der Effektivität der Grenzflächenmessung von I-125-Konversionselektronen mittels Szintillatorfolie SPF-312 wird die unspezifische Adsorption von I-125-Insulin verwendet. Eine Szintillationsküvette wurde mit 12 ml Insulinlösung einer Konzentration von $45,4\ \mu\text{g/ml}$ und einer radioaktiven Konzentration an I-125-Insulin von $1,67\ \text{kBq/ml}$ gefüllt und eine Szintillatorfolie SPF-312, $1,1 \times 3,5\ \text{cm}^2$, Dicke $200\ \mu\text{m}$, eingetaucht. Die Zählrate Z wurde im ^3H -Kanal eines Szintillationsspektrometers in Abhängigkeit von der Zeit t gemessen.

Am zeitlichen Anstieg der Zählrate kann die Adsorptionskinetik des Insulins verfolgt werden. Anhand einer mit Iodid-125 markierten $0,1\ \text{M KI}$ -Lösung, die von der Folie nicht adsorbiert wird, wurde die auf γ -Absorption beruhende Zählrate Z_γ einer gleichen Aktivitätsmenge gemessen. Ferner wurde durch γ -Messung der aus der Lösung entfernten Folie die adsorbierte Insulinmenge m_{ads} bestimmt:

Tabelle 1

| | t (min) | Z (min^{-1}) | $Z - Z_\gamma$ | (min^{-1}) |
|--------------------------------------|-----------|---------------------------|----------------|-----------------------|
| $Z_\gamma = 1\ 690\ \text{min}^{-1}$ | 5 | 4 100 | 2 410 | |
| | 30 | 4 697 | 3 007 | |
| $m_{\text{ads}} = 8,43\ \mu\text{g}$ | 60 | 4 720 | 3 030 | |
| | 125 | 4 865 | 3 175 | |
| | 250 | 5 003 | 3 313 | |
| $\hat{=} 1,55\ \%$ | | | | |

In Spalte 3 der Tabelle 1 ist als Differenz von Gesamtzählrate und γ -Effekt die durch Konversionselektronen des adsorbierten Insulins ausgelöste Zählrate dargestellt. Die nach 250 min ermittelte Sättigungszählrate an Konversionselektronen entspricht einer adsorbierten Insulinmenge von $8,43\ \mu\text{g}$ Insulin oder 1,55 % der eingesetzten Aktivitätsmenge. Damit ergibt sich die Meßeffectivität η_K der Konversionselektronen an der Adsorptionsschicht zu

$$\eta_K = \frac{3\ 313}{0,0155 \cdot 12 \cdot 1\ 670 \cdot 60} = 0,179$$

und der γ -Aktivität zu

$$\eta_\gamma = \frac{1\ 690}{12 \cdot 1\ 670 \cdot 60} = 0,0014$$

Das bedeutet, daß die Adsorptionsschicht mit 126mal so großer Effectivität gemessen wurde wie die homogene Lösung.

2. Teströhrchen aus Polystyren wurden durch Ausspülen mit je 3 ml Szintillatorlösung und anschließendes Trocknen an der Luft mit einer szintillationsfähigen Schicht versehen. Die Szintillatorlösung enthielt:

200 mg Diphenyloxazol
 26 mg Bis(phenyloxazolyl)-benzol
 700 mg Polystyren

in 10 ml Toluol.

Durch Inkubation der Röhrchen mit 3 ml Insulinlösung der Konzentration $60 \mu\text{g/ml}$ mit einer I-125-Insulinaktivität von 685 Bq ergab sich eine Sättigungsadsorption von $10,2 \mu\text{g}$ Insulin entsprechend 5,7 %.

Die entsprechenden Zählraten und Effektivitäten sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

| Z | Z_K | Z_γ | η_K | η_γ | $\frac{\eta_K}{\eta_\gamma}$ |
|-------|-------|------------|----------|---------------|------------------------------|
| 1 385 | 807 | 578 | 0,344 | 0,014 | 24,5 |

Gegenüber Beispiel 1 ist die Ausbeute der Konversionselektronenmessung verdoppelt, die Selektivität der Grenzflächenmessung jedoch auf 25 gesunken.

3. Mit Szintillatorlösung beschichtete Proberöhrchen nach Beispiel 2 wurden durch 20stündige Inkubation mit einer Insulin-Antiserumlösung in 0,05 N Boratpuffer, $\text{pH} = 9,4$, mit insulinbindenden Antikörpern beschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen 20 h mit einer I-125-Insulin-Indikatorlösung (ROTOP-Testsatz Insulin) inkubiert. In die mit gebundenem I-125-Insulin versehenen Teströhrchen wurde inaktives Standard-Insulin (ROTOP-Testsatz Insulin) eingefüllt. Die Röhrchen wurden im ^3H -Kanal eines Szintillationsspektrometers gemessen.

Nach einer Inkubationszeit von 4 h ergaben sich in Abhängigkeit vom Zusatz an Standardinsulin m_{St} die Zählraten Z (Tabelle 3).

In dieser Form der Durchführung wird der γ -Untergrund weitgehend herabgesetzt. Zur praktischen Bestimmung von Insulin in einem gewissen Konzentrationsbereich ist eine jeweilige Optimierung der Ansatzrezeptur nach den für RIA allgemein bekannten Richtlinien durchzuführen.

Tabelle 3

| Z (min^{-1}) | m_{St} (ng) |
|-------------------------|----------------------|
| 2 921 | 0 |
| 2 630 | 1,74 |
| 2 392 | 3,85 |
| 2 235 | 8,72 |