NORGE

STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

Utlegningsskrift nr. 125067

Int. Cl. G 01 n 33/16 Kl. 42 l-3/54
A 61 k 23/00 30h-6

Patentsøknad nr. 914/70 Inngitt 13.3.1970
Løpedag –
Søknaden alment tilgjengelig fra 15.9.1970
Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 10.7.1972
Prioritet begjært fra: 14.3.1969 Finland, nr. 762/69

Thomas Tallberg,
Enåsvägen 16 A, Helsinki 20, Finland.

Oppfinner: Søkeren.

Fullmektig: Siv.ing. Audun Kristensen.

Preparat for påvising av antigen som forekommer i fysiologiske mengder og fremgangsmåte for fremstilling av et slikt preparat.

Foreliggende oppfinnelse angår et preparat for påvising av antigen som forekommer i fysiologiske mengder og en fremgangsmåte for fremstilling av et slikt preparat.

Oppfinnelsen angår således et preparat for påvising av antigen som forekommer i fysiologiske mengder, omfattende en suspensjon av vannuopplöselige, antistoff-aktive proteinpolymerpartikler av et antiserum mot det angjeldende antigen, og det særegne ved preparatet i henhold til oppfinnelsen er at partiklene er belagt med en hovedsakelig immunologisk ekvivalent mengde av det spesifikke eller kryssreagerende antigen, idet suspensjonen ytterligere inneholder en opp-

lösning av et antiserum som reagerer med antigenet og i en konsentrasjon som gir en prozonevirkning, slik at dette falskt negative kompleks ved tilsetning av små mengder av vedkommende antigen forskyves ut av prozonefasen med en tydelig agglutinasjon som følge.

Oppfinnelsen angår videre en fremgangsmåte for fremstilling av nevnte preparat, og det særegne ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen er at det angjeldende antiserum polymeriseres på og i og for seg kjent måte til et vann-uopplöselig proteinpolymerisat, som homogeniseres til en homogen suspensjon av antistoff-aktive polymerpartikler, hvoretter suspensjonen podes med en hovedsakelig immunologisk ekvivalent mengde av et spesifikt eller kryss-reagerende antigen, de belagte partikler vaskes og resuspenderes, og en opplösning av et antiserum som reagerer med antigenet tilsettes i en konsentrasjon som gir en prozonevirkning.

Andre trekk ved oppfinnelsen fremgår av patentkravene.

Immunologiske tester anvendes i ganske stor utstrekning for diagnostiske formål i moderne medisinsk praksis. Med immunologiske metoder kan eksempelvis fysiologiske mengder av forskjellige antigene stoffer, så som hormoner, enzymer og forskjellige sera eller vevproteiner påvises og måles. Disse metoder bygger på at forskjellige antigener eller også antistoffer er adherert til eller bundet til passende bærerpartikler, hvorved det er oppnådd indikatorpartikler for forskjellige immunologiske reaksjoner. Som eksempel kan nevnes immunologiske tester for påvising av graviditet på et tidlig stadium. Disse tester bygger på at det antigene hormon humant chorion-gonadotropin (HCP), som frembringes av placentaen i begynnelsen av graviditeten, blir absorbert eller kjemisk bundet til bærerpartikler som består av spesielt behandlede röde blodlegemer eller latekspartikler. Når et antiserum mot HCG settes til slike sensibiliserte indikatorpartikler skjer en agglutinasjon av partiklene. Hvis imidlertid en dråpe urin fra en gravid kvinne, som inneholder HCG, blandes med en dråpe anti-HCG-serum i en viss fortynning og deretter tilsettes indikatorpartiklene, inhiberes den nevnte agglutinasjon, mens tilsvarende test utfört med urin fra en ikke-gravid kvinne ikke påvirker anti-HCG-titeren slik at agglutinasjonen kan skje uhindret.

I stedet for antigen har også spesifikke antistoffer kunnet festes til spesielt preparerte bærerpartikler, og slike antistoff-aktive immun-adsorbenter er anvendt f.eks. for å måle insulinmengden i serum tatt fra normale og diabetiske individer.

Ved slike tidligere kjente klinisk anvendbare immunologiske metoder er det således alltid blitt anvendt bærerpartikler, til eller på hvilke forskjellige antigener eller antistoffer er adherert eller bundet kjemisk. Foreliggende oppfinnelse derimot bygger på anvendelsen av vann-ulöselige antistoffaktive protein-polymerpartikler av spesifikke antisera. Slike protein-polymerpartikler kan fremstilles under anvendelse under f.eks.den teknikk som er beskrevet av S. Avrameas og T. Thernynck i J.biol.Chem. 1967, 242, s. 1651, idet polymeriseringen ble foretatt med etylklorformiat, eller i Immunochemistry, 1969, 6, s. 53-, idet polymeriseringen ble foretatt med glutaraldehyd. Det oppnås herunder polymere pastaer med en viss bibeholdt spesifikk antistoff-aktivitet. Disse polymerpastaer blir deretter viderebehandlet ved mekanisk finfordeling og ved hjelp av ultralyd på den måte som ble beskrevet tidligere i Ann.Med.Exp. Biol. Fenn., 1967, 45, s. 477-.

På denne måten blir det oppnådd antistoff-aktive, meget små protein-polymerpartikler av den type som skjematisk er vist i vedföyde tegnings fig. 1, hvor antigenet humant placenta-laktogen-hormon (HPL) blir anvendt som typeeksempel. Disse partikler har omtrent störrelse som eller er mindre enn små bakterier, og de kan således tydelig visualiseres i elektronmikroskop. En dråpe av en slik immunologisk sett spesifikk partikkelsuspensjon anbragt på eksempelvis en glasskive oppförer seg som en opaliserende homogen opplösning. Denne homogene suspensjon er stabil, dvs. at en tilsetning av fysiologisk pufferopplösning ikke forårsaker noen utfelling eller uspesifikk agglutinasjon, selv om den inneholder forskjellige fremmede proteiner eller heterologe antigensubstanser. Hvis imidlertid den ekvivalent mengde av det homologe antigen i en fysiologisk pufferopplösning tilsettes suspensjonen, skjer en agglutinasjon, slik som påvist i den ovenfor nevnte artikkel. Med visse såkalte "svake" antigener uteblir imidlertid denne

visuelt tydelig registrerbare agglutinasjon. Som eksempel på slike antigener kan nevnes humant placenta-laktogen (HPL), humant choriongonadotropin (HCG) og insulin.

Det har imidlertid vist seg at tross denne uteblitte agglutinasjon, har de antistoff-aktive partikler spesifikt opptatt sitt homologe antigen og derved blitt immunologisk merket eller belagt med sitt antigen. En immunologisk belagt partikkel er vist i vedföyde tegnings fig. 2 En forholdsvis lang pode-eller inkuberingstid, eksempelvis 1-3 dögn, er fordelaktig, idet antigenet da når å feste seg bedre til antistoffets bindingssteder. For belegget anvendes hensiktsmessig immunologisk ekvivalente mengder eller eventuelt et lite underskudd av antigenet. Bare ytterst små mengder av antigenet trenges for å oppnå et fullstendig belegg, og antigenpreparatet trenger endog ikke å være fullstendig rent. Podingen skjer i suspensjonen i en fysiologisk puffer, og prosessen kan fremmes ved nærvær av en liten mengde tensid (overflateaktivt middel) f.eks. et tensid med handelsbetegnelsen "Tween 20" (et sorbitan-monolaurat-polyoksydalkylenderivat) i en konsentrasjon av ca. 0,2%.

Etter podingen vaskes partiklene 2-3 ganger i en fysiologisk fosfatpuffer ved hjelp av sentrifugering og resuspenderes. De partikler som således oppnås reagerer immunologisk som följe av at det antigen som er bundet til dem ved tilsetning av et homologt eller kryssreagerende antiserum i optimal fortynning, og de kan derved anvendes som indikator-partikler for direkte å påvise spesifikke antigener ved å anvende den såkalte agglutinasjons-inhibisjonsteknikk.

Indikator-partiklene har dog tilböylighet til ikke å oppvise noen tydelig merkbar agglutinasjon hvis det agglutinerte antiserum anvendes i altfor konsentrert form. Med immunologisk belagte polymerpartikler kan dette falskt negative, eller såkalte prozonefenomen, strekke seg opp til fortynninger på 1:160 av antiserumet, mens de fortynninger av samme serum som bevirker agglutinasjon kan være eksempelvis 1:320 - 1:1600.

Dette prozone-fenomen utnyttes som basis for den foreliggende oppfinnelse for å oppnå et reagenspreparat som gjör det mulig å påvise

og også måle fysiologiske og små mengder av et antigen ved hjelp av en eneste reagensopplösning.

For dette formål utföres det med de immunologisk belagte polymerpartikler som er oppnådd på den måten som er beskrevet ovenfor forsöksserier mot homologe antisera i dobbelt fortynnings-serier, f.eks. 1:20 - 1:320, for å fastslå prozone-fasen for vedkommende antigen-antistoff-reaksjon. På grunnlag av disse forsök blandes polymerpartikkel-suspensjon med et antiserum med passende konsentrasjon, eksempelvis 1:20 - 1:40 og det oppnås derved et ferdig homogent reaksjonspreparat. Dette inneholder små polymerpartikler som omfatter en kjerne av antistoff-aktiv proteinpolymer omgitt av antigen som er immunologisk festet til denne, og hvis övrige determinanter er mettet med et ytre lag av motlegemer. Denne såkalte "sandwich"-struktur er vist i fig. 3 i tegningene.

Hvis en dråpe av reagenssuspensjonen som er fremstilt på denne måten tilsettes en opplösning som inneholder til og med meget små mengder av det angjeldende antigen, skjer en forskyvning av fortynningen eller titeren ut av prozone-fasen med en tydelig agglutinasjon som följe. Som eksempel på brukbarheten av preparatet i henhold til oppfinnelsen kan nevnes et preparat fremstilt på den måten som er beskrevet ovenfor med proteinhormonet humant placentalaktogen (HPL), som forekommer i en gravid kvinnes serum, urin eller saliva, etter förste trimester. Preparatet kan anvendes for kvantitativt og kvalitativt å påvise HPL, idet en gravid kvinnes serum gir en agglutinasjonsvirkning, mens en likedan mengde normalt humant serum fra en ikke-gravid kvinne ikke evner å forskyve reagenskomplekset inn i agglutinasjonsfasen og derved viser at testen er negativ, dvs. HPL ikke frembringes.

Oppfinnelsen illustreres nærmere ved hjelp av följende utförelseseksempler.

Eksempel 1. Påvisning av HPL.

En halv ml. anti-HPL-aktive polymerpartikler, fremstilt på den ovenfor beskrevne måte fra fåre-antihormonserum, inkuberes med en

halv ml. HPL 200 µg/ml i en fysiologisk fosfatpufret saltvannslösning (PBS). Etter inkubering i +4°C i löpet av tre dögn vaskes partiklene (2 x 5 ml. PBS) ved hjelp av hård sentrifugering og partiklene resuspenderes i 2ml. PBS. Etter at de störste partiklene er sedimentert, anbringer man dråper av det svakt opaliserende supernatat, som innholder partikler av omtrent en bakteries störrelse, på en plate. Til hver dråpe tilsettes en dråpe anti-HPL-serum i en dobbelt fortynningsrekke. Av dette fremgår at visse lave fortynninger som f.eks. til og med 1:80 ikke forårsaker en tydelig agglutinasjonsreaksjon, idet prøven forblir uagglutinert i den såkalte prozone-fasen, mens 1:200 - 1:2000 med samme indikatorpartikkel-suspensjon gir en tydelig agglutinasjon.

Man velger da f.eks. å sammenblande en halv ml av disse immunologisk belagte partikler med anti-HPL-serum 1:20 (dvs. to trinn under den siste prozone-fortynningen). Denne falsk negative "prozone"-suspensjonen er ganske stabil og brukbar som indikatorreagens etter tilsetning av et baktericid tensid (overflateaktivtmiddel), som f.eks. "Tween 20", i en konsentrasjon på ca. 0,2%. Hvis en dråpe av denne reagenslösning blandes på en glassplate med en dråpe serum fra en gravid kvinne, som befinner seg i slutten av graviditeten, agglutineres partiklene. Dette skjer også om partiklene sammenblandes med en lösning som innheolder 1-10 µg/ml HPL.

Hvis en dråpe av denne reagenslösning blandes på en glassplate med en dråpe serum fra en ikke-gravid kvinne, idet da serumet følgelig ikke inneholder HPL i fri form, skjer ingen agglutinasjon av indikatorpartiklene. En uteblitt agglutinasjon indikerer at den undersökte lösning ikke inneholder HPL i fysiologiske konsentrasjoner.

Eksempel II. Påvisning av HCG.

En halv ml. anti-HCG-aktive polymerartikler fremstilt på den ovenfor beskrevne måte fra fåre-antihormon-serum podes med en halv ml. HCG 150 µg/ml (ca. 3000 I.E mg) i PBS under de i Eks. 1 angitte

betingelser. Viderebehandlingen ved vasking og sentrifugering foretas som i Eks. 1. Med supernatet gjennomföres en dobbeltfortynningsrekke med anti-HCG-serum, hvorved man erholder agglutinasjon ved fortynninger mellom 1:200 og 1:5000. En "prozone"-suspensjon fremstilles på samme måte som i Eks. 1 av en halv ml immunologisk belagte partikler og anti-HCG-serum 1:20.

Hvis en dråpe av denne reagenslösning blandes med en dråpe serum fra en gravid kvinne, som befinner seg i begynnelsen av graviditeten, erholdes agglutinasjon, liksom også med en lösning som inneholder 0,25 - 10 µg/ml HCG. HCG produseres av placentaen i begynnelsen av graviditeten, såvel som også i forbindelse med visse tumorer.

Preparatet i henhold til oppfinnelsen er så enkelt å bruke at det ikke forutsetter utdannet personale for å gjennomföre pröver, idet disse kan gjöres av pasienten selv. Foruten det HPL-preparat som er nevnt ovenfor kan tilsvarende preparat av HCG-hormon brukes for på et tidlig stadium å påvise graviditet, hormonproduserende tumorer osv. Endog fetuinprotein i humant serum, samt "Pregnant Mare Serum" (PMS) som forekommer hos drektige dyr, og f.eks. insulin egner seg for prövetagning ved bruk av preparat i henhold til oppfinnelsen. Ved insulin-bestemmelsen brukes det dog hensiktsmessig radioaktivt merket antigen og forholdet mellom det fri og det antigen som er bundet til partiklene måles ved hjelp av en scintillator.

Preparatet i henhold til oppfinnelsen egner seg også som indikatorer for anvendelse ved rensing av forskjellige antigene substanser.

PATENTKRAV.

1. Preparat for påvisning av antigen som forekommer i fysiologiske mengder, omfattende en suspensjon av vannuopplöselige, antistoffaktive protein-polymerpartikler av et antiserum mot det angjeldende antigen, k a r a k t e r i s e r t v e d at partiklene er belagt med en hovedsakelig immunologisk ekvivalent mengde av det spesifikke eller kryssreagerende antigen, og at suspensjonen ytterligere inneholder en opplösning av et antiserum som reagerer med antigenet og

i en konsentrasjon som gir en prozone-virkning, slik at dette falskt negative kompleks ved tilsetning av små mengder av vedkommende antigen forskyves ut av prozone-fasen med en tydelig agglutinasjon som følge.

2. Preparat som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder en liten mengde tensid (overflateaktivt middel).

3. Fremgangsmåte for fremstilling av det preparat som er angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det angjeldende antiserum polymeriseres på i og for seg kjent måte til et vannuopplöselig proteinpolymerisat, som homogeniseres til en homogen suspensjon av antistoffaktive polymerpartikler, hvoretter suspensjonen podes med en hoved-sakelig immunologisk ekvivalent mengde av et spesifikt eller kryssreagerende antigen, de belagte partikler vaskes og resuspenderes, og en opplösning av et antiserum som reagerer med antigenet, tilsettes i en konsentrasjon som gir en prozone-virkning.

4. Fremgangsmåte som angitt i krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at podingen av de antistoff-aktive polymerpartikler med antigen skjer i nærvær av en liten mengde tensid.

Anførte publikasjoner: -

Fig. 1

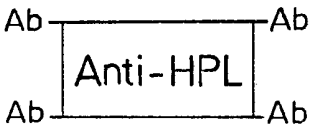


Fig. 2

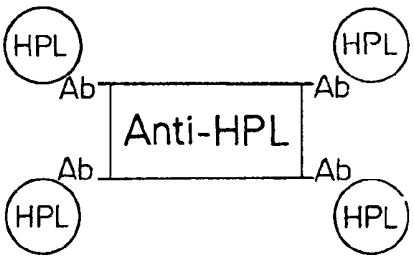


Fig. 3

