



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **236 400 A1**

4(51) G 01 N 33/543

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 275 408 1

(22) 22.04.85

(44) 04.06.86

(71) Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Direktorat für Forschung, 2200 Greifswald, R.-Petershagen-Allee, DD

(72) Döhner, Leopold, OMR Prof. Dr. sc. med.; Herrmann, Helmut, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zum Beschichten fester Phasen für den Immunoassay

(57) Die vorgestellte Erfindung bezieht sich auf die Verbesserung der in medizinischer und biologischer Diagnostik weit verbreiteten Verfahren des Festphasen-Immunoassays. Ihr Ziel ist eine Steigerung der Effektivität der in diesem Verfahren notwendigen physikalischen Adsorption eines Partners der biologisch aktiven Verbindungen, wie Antigene, Antikörper usw., an feste Phasen (Träger), wie zum Beispiel Reaktionsträger aus Polystyrol, Polyvinylchlorid u. a. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß auf die Oberfläche dieser festen Phasen ein dünner Film von in Lösungsmitteln gelöster nitrierter Zellulose aufgebracht wird. Die Erfindung kann in der Produktion entsprechender diagnostischer Testsätze durch Betriebe für immundiagnostische Präparate eingesetzt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zum Beschichten fester Phasen für den Immunoassay zur Adsorption von Antigenen, Antikörpern oder anderen biologisch aktiven Substanzen an Oberflächen von Festphasen (Trägern) aus unterschiedlichen Materialien, wie zum Beispiel Polystyrol, Polyvinylchlorid und andere Produkte, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Oberflächen der Träger vor der Adsorption der Substanzen mit einem dünnen Film von nitrierter Zellulose versehen werden.
2. Verfahren nach Punkt 1 **gekennzeichnet dadurch**, daß die nitrierte Zellulose in einem die Oberfläche der Festphasen nicht angreifenden Lösungsmittel, vorzugsweise Methanol, gelöst wird und in Konzentrationen von 0,1 und weniger Prozent auf diese Oberflächen, im Festphasen-Immunoassay vorzugsweise Mikrotestplatten oder Teströhrchen, durch Einfüllen oder Eintauchen aufgetragen wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2 **gekennzeichnet dadurch**, daß das Lösungsmittel bei Temperaturbedingungen, die für das jeweilige Trägermaterial unbedenklich sind, vorzugsweise zwischen 15 °C und 50 °C, abgedampft wird und ein dünner Film nitrierter Zellulose auf der Festphase zurückbleibt, an dem biologisch aktive Substanzen adsorptiv gebunden werden können.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Beschichten fester Phasen (Träger) für den Immunoassay. Dieses dient der Verbesserung der Adsorption von Antigenen oder Immunglobulinen und anderen organischen Verbindungen an feste Phasen, wie zum Beispiel Mikrotestplatten aus Polystyrol, Polyvinylchlorid und anderen Materialien. Es läßt sich in immunologischen Techniken einsetzen, die vorwiegend in der medizinischen, veterinärmedizinischen und biologischen Diagnostik und Forschung zur Darstellung von Antigenen, Antikörpern oder Immunkomplexen genutzt werden. Diese dienen dem Nachweis von Krankheitserregern oder Stoffwechselprodukten unterschiedlichster Genese im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen sowie von Antikörpern gegen diese und, meist in Siebstests, der Analyse von Immunreagenten, wie zum Beispiel monoklonalen Antikörpern oder mikrobiellen Antigenen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Mehrzahl der beschriebenen Verfahren des Immunoassay (Radioimmunoassay, RIA, Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, u. a.) erfordert die Trennung von in die Reaktion eingegangenen Immunkomplexen und nicht reagierenden Immunreaktanden. Diese Trennung wurde durch Binden von Antikörpern oder anderen proteinhaltigen Verbindungen (Antigene) an eine feste Phase erreicht (Catt u. Mitarb., Biochem. J. 100, 1966, 31C–33C; Wide und Porath, Biochim. Biophys. Acta 130, 1966, 257–260).

Das Verfahren nutzt die Tatsache aus, daß sich Proteine und andere Reagenten offensichtlich über hydrophobe Wechselwirkungen als praktisch monomolekularen Film an verschiedene Kunststoffe binden können. Die Menge des adsorptiv gebundenen Proteins ist proportional der Konzentration der Proteine in den Lösungen.

Die Bindungsfähigkeit für Proteine ist bei Mikrotestplatten verschiedener Firmen und Chargen nicht gleich. Außerdem lassen sich nicht alle Eiweißkörper gleich gut absorbieren und zeigen diese Träger in unterschiedlichem Maße unspezifische Adsorptionen während der auf die Bindung folgenden immunologischen Reaktionsschritte, die die Ergebnisse wesentlich beeinträchtigen können. (Kenny und Dunsmoor, J. Clin. Microbiol. 17, 1983, 655–665; Shekarchi u. Mitarb., J. Clin. Microbiol. 19, 1984, 89–96). Um diesen Nachteil zu beheben, ist verschiedentlich versucht worden, dem Kunststoffträger durch Behandeln der Oberflächen mit organischen Lösungsmitteln bessere adsorptive Eigenschaften zu verleihen (siehe Patente DE 2 509 895 [GB 52653-76] oder DT 2 509 895 u. a.). Auch das Aufbringen von vernetzten Materialien auf Kunststoff-Formkörper wird angeboten (OS 2 337 095 [JP 72577-72]). Ebenso sind kovalente Bindungen über reaktive Gruppen an verschiedenartige feste Phasen (Träger) häufig beschrieben worden, haben jedoch wegen des größeren technischen Aufwandes in Verfahren des Immunoassay nur begrenzt Anwendung gefunden. Die uns bekannten Verfahren sind damit in der Regel mit einem höheren technischen Aufwand verbunden und haben deshalb nach unseren Kenntnissen bisher keine weitere Verbreitung erlangt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist, immunologisch aktive biologische Substanzen, das sind Antigene oder Antikörper, wirkungsvoller und besser reproduzierbar adsorptiv an feste Phasen (Träger), vorzugsweise aus Polystyrol, Polyvinylchlorid und anderen Kunststoffen sowie Glas usw., zu binden. Die sich innerhalb der industriellen Fertigung weiter entwickelnde Produktion von Testbestecken für Verfahren des Festphasen-Immunoassay soll effektiver und gegebenenfalls kostengünstiger gestaltet werden, indem die oft teuren biologischen Substanzen in geringeren Konzentrationen eingesetzt werden können. Weiterhin soll durch die bessere Bindung der Reagenten an die Träger die Produktion eine größere Stabilität im Vergleich zum derzeitigen Stand erreichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, daß eine verbesserte Adsorption von Antigenen und Antikörpern an feste Phasen (Träger) erlaubt.

Erfindungsgemäß wird sie dadurch gelöst, daß ein Träger mit einer Lösung von nitrierter Zellulose, vorzugsweise 0,1 bis 0,001 Prozent, in einem für ihn unschädlichen Lösungsmittel, vorzugsweise Methanol, beschickt und anschließend das Lösungsmittel verdampft wird. Bei Verwendung gebräuchlicher Mikrotestplatten kann diese Beschichtung durch ein Tauchverfahren

oder durch Einfüllen von 0,050 bis 0,250 ml dieser Lösungen in die einzelnen Vertiefungen (Becher) mit anschließendem Verdampfen bei Temperaturen erfolgen, die für die benutzten Materialien unschädlich sind, vorzugsweise zwischen 15 °C und 50 °C. Die auf solche Weise vorbehandelten Mikrottestplatten werden in den bekannten Verfahren des ELISA als feste Phasen (Träger) eingesetzt. Wir beschreiben benutzte immunologische Testsysteme und Verfahren unter Ausführungsbeispiel.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

2 Mikrottestplatten aus Polystyrol (Scopyrol), glasklar, Flachbodenform (VEB MLW Polyplast Halberstadt, DDR - 3600 Halberstadt).

Platte 1 wie oben angegeben mit 0,1 % nitrierter Zellulose in Methanol vorbehandelt (0,100 ml je Vertiefung).

Platte 2 nicht vorbehandelt.

Auf beiden Mikrottestplatten (feste Phase) wurde der ELISA in folgender gleicher Weise durchgeführt:

1. Adsorption von 0,025 mg pro ml Immunglobulin Anti-Adenovirus Typ 2 in Adsorptionspuffer-Lösung, pH 9,6, 16 Std. bei 4 °C. In jede der jeweils 96 Vertiefungen wurden 0,100 ml eingefüllt (0,0025 mg).
2. Dreimaliges Spülen mit Natriumchlorid-Phosphatpuffer-Lösung unter Zusatz von 0,05 % Tween 20 und 0,02 % Natriumazid (PBST), pH 7,2.
3. Einfüllen von je 0,100 ml Antigen Adenovirus Typ 2 Hexon (0,010 mg/ml) in PBST und 2 Std. Inkubation bei 30 °C.
4. Fünfmaliges Spülen wie unter 2.
5. Einfüllen von je 0,100 ml Globulin Anti-Adenovirus Typ 2, markiert mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) und 2 Std. Inkubation bei 30 °C.
6. Spülen wie unter 4.
7. Einfüllen von je 0,250 ml 4-Nitrophenylphosphat (4-NPP) in Diäthanolaminpuffer-Lösung, pH 9,8, und Inkubation 1 Std. bei 30 °C.
8. Zufügen von je 0,025 ml 3N Natronlauge zum Stoppen der Enzymreaktion.
9. Messen der Extinktion der einzelnen Proben bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ ($E_{400 \text{ nm}}$) im Spektralkolorimeter Spekol (Kombinat VEB Carl Zeiss JENA, DDR - 6900 Jena) unter Verwendung des Extinktionsmeßansatzes EKA und Mikroabsaugküvette.
10. Errechnen der mittleren Extinktionen der Proben und ihrer Standardabweichungen.

Ergebnis:

Mit nitrierter Zellulose vorbehandelter Träger:

$$E_{400 \text{ nm}} = 1,06 \pm 0,14 \text{ (VK = 13,4 \%)}$$

Träger nicht vorbehandelt (Kontrolle):

$$E_{400 \text{ nm}} = 0,542 \pm 0,081 \text{ (VK = 14,9 \%)}$$

Durch das vorangehende Beschichten der festen Phase (Träger) mit nitrierter Zellulose läßt sich die meßbare Extinktion als Folge verbesserter Adsorption des Immunglobulins auf etwa 200 % (195,6 %) im dargestellten Beispiel steigern.

Beispiel 2

Die Träger wie in Beispiel 1 wurden parallel mit 0,1 %; 0,01 % und 0,001 % nitrierter Zellulose in Methanol beschichtet. Die Kontrolle ist nicht beschichtet worden.

Vergleiche Figur 1.

Der ELISA wurde wie unter Beispiel 1 in folgenden Schritten ausgeführt (Waschprozesse und Nachweisreaktion mit 4-NPP sind nicht nochmals aufgeführt):

1. Adsorption von Antigen Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) in den Konzentrationen 0,024 mg/ml; 0,012 mg/ml; 0,006 mg/ml und 0,003 mg/ml (das entspricht den Ziffern 1, 2, 3 bzw. 4 der Figur 1).
2. Inkubation von Serum Anti-Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) in der stets gleichen Gebrauchsverdünnung 10^{-3} .
3. Inkubation von Globulin Anti-Kaninchenglobulin (IgG), markiert mit dem Enzym AP.

Ergebnis (Figur 1):

Die Steigerung der Adsorption des Antigens nach dem Beschichten kann selbst bei Einsatz von 0,001 % nitrierter Zellulose noch etwa 200 % erreichen und liegt bei Verwendung höherer Konzentrationen darüber. Die Höhe der Extinktionen $E_{400 \text{ nm}}$ ist von der Menge des eingesetzten Antigens abhängig und zeigt die gleichen Tendenzen wie in der nicht vorbehandelten Kontrolle.

Beispiel 3

Die Träger wurden parallel mit zwei verschiedenen Mustern nitrierter Zellulose zu 0,1 % in Methanol beschichtet. Die Kontrollen sind nicht beschichtet worden. Der ELISA wurde wie unter Beispiel 1 in folgenden Schritten ausgeführt (Waschprozesse und Nachweisreaktion mit 4-NPP sind nicht nochmals aufgeführt):

1. Adsorption von Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) in einer Gebrauchsverdünnung.
2. Inkubation von Serum Anti-Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) vom Kaninchen in den Verdünnungsstufen 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$ und $7,5 \cdot 10^{-4}$.
3. Inkubation von Globulin Anti-Kaninchenglobulin (IgG), markiert mit dem Enzym AP.

Ergebnis:

Die Tabelle 1 zeigt die gemessenen Extinktionen $E_{400 \text{ nm}}$. Es sind Mittelwert M und Standardabweichung s angegeben.

Serum- verdünnung	Kontrolle		Muster I		Muster II	
	M	s	M	s	M	s
10^{-3}	0,457	0,030	2,34	0,08	2,31	0,14
$5 \cdot 10^{-3}$	0,366	0,034	1,55	0,14	1,50	0,18
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,189	0,015	0,476	0,087	0,473	0,026
$7,5 \cdot 10^{-4}$	0,100	0,005	0,214	0,030	0,226	0,030

Tabelle 1

Zwischen Proben nitrierter Zellulose unterschiedlicher Herkunft sind keine signifikanten Differenzen festzustellen.

Beispiel 4

Die Träger wurden wie in Beispiel 1 mit 0,1 % nitrierter Zellulose beschichtet. Die Kontrollen sind nicht beschichtet worden. Der ELISA wurde wie unter Beispiel 1 in folgenden Schritten ausgeführt (Waschprozesse und Nachweisreaktion mit 4-NPP sind nicht nochmals aufgeführt):

1. Adsorption von Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) in Konzentrationen von 100; 25; 6,25 und 3,13 $\mu\text{g/ml}$.
2. Inkubation von Serum Anti-Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) vom Kaninchen in den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis $5 \cdot 10^{-4}$.
3. Inkubation von Globulin Anti-Kaninchenglobulin (IgG), markiert mit dem Enzym AP.

Ergebnis (Figur 2):

Es sind die für verschiedene Konzentrationen von Antigen Influenzavirus auf der festen Phase (Träger) erhaltenen Extinktionen E_{400 nm} gegen die Serumverdünnungen des 2. Inkubationsschrittes aufgetragen und die erhaltenen Punkte durch Linien verbunden worden. Die Schnittpunkte der Horizontalen, die bei E_{400 nm} = 0,300 gezogen wurden, mit den erhaltenen Kurven sind durch vertikale Linien auf die die Serumverdünnungen darstellende Achse (X) projiziert worden. Der obere Teil der Figur 2 zeigt die Titrationskurven des Antiserums auf den verschiedenen Konzentrationen Antigen, das nach Beschichten der Träger mit nitrierter Zellulose adsorbiert wurde. Im unteren Teil sind die Parallelen auf vorher nicht beschichteten Trägern dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, daß auch geringe Konzentrationen des Antigens auf vorher mit nitrierter Zellulose beschichteten festen Phasen ausreichend hohe Extinktionen ergeben. Die Neigung der Kurven hängt von der Konzentration des Antigens ab. Die erhaltenen Serumtiter (Schnittpunkte der vertikalen Linien) sind weitgehend unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Antigens und betragen etwa $3 \cdot 10^{-4}$. Die Titrationskurven auf den als Kontrolle dienenden Trägern, die vorher nicht mit nitrierter Zellulose beschichtet wurden, sind bedeutend flacher. Dazu kommt in den höheren Konzentrationen des Antigens ein deutlicher Prozoneeffekt, der störend wirkt; möglicherweise zurückzuführen auf die geringere Adsorptionsfähigkeit, so daß während der Waschprozesse Immunkomplexe abgelöst werden. Der Serumtiter von etwa $3 \cdot 10^{-4}$ ist ebenfalls zu ermitteln; allerdings müssen höhere Konzentrationen des Antigens (mindestens 25 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt werden.

Es reicht folglich bei vorhergehendem Beladen mit nitrierter Zellulose eine etwa 10fach geringere Menge Antigen aus, um reproduzierbare Werte zu erhalten.

Analoge Ergebnisse werden erhalten, wenn Immunglobuline (Antikörper) an die feste Phase (Träger) gebunden werden und der Titer von Antigen-Lösungen auf diesen zu bestimmen ist.

Beispiel 5

Es wurde der Einfluß unspezifischer Adsorptionsreaktionen in den immunologischen Reaktionsschritten an den Trägern vergleichend untersucht (Figur 3).

Die Träger wurden wie in Beispiel 1 mit 0,1 % nitrierter Zellulose beschichtet. Die Kontrollen sind nicht beschichtet worden. Der ELISA wurde wie in Beispiel 1 in folgenden Schritten ausgeführt (Waschprozesse sind nicht nochmals aufgeführt):

1. An die Träger wurden parallel nachfolgend genannte Antigene adsorbiert: (1) – Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1); (2) – Lipopolysaccharid-Extrakt (LPS) aus *Brucella abortus*; (3) – 1%ige Lösung von humanem Serumalbumin; (4) – 1%ige Lösung von Kälberserum; (5) – reine Adsorptionspuffer-Lösung, pH 9,6, d. h. kein Antigen.
2. Inkubation eines humanen Serums, das Antikörper gegen Influenzavirus A enthält, in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-1}$ auf allen Antigenen.
3. Inkubation von Globulin Anti-Humanglobulin, markiert mit den Enzymen Alkalische Phosphatase (AP-AHuG) oder Meerrettich-Peroxidase (POD-AHuG).
4. Nachweis der enzymatischen Aktivität von AP wie unter Versuch 1 beschrieben; Nachweis der enzymatischen Aktivität von Peroxidase mit o-Phenylendiamin (OPD) und Wasserstoffperoxid sowie Stoppen der Reaktion mit 4N Schwefelsäure und Messen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm.

Ergebnis:

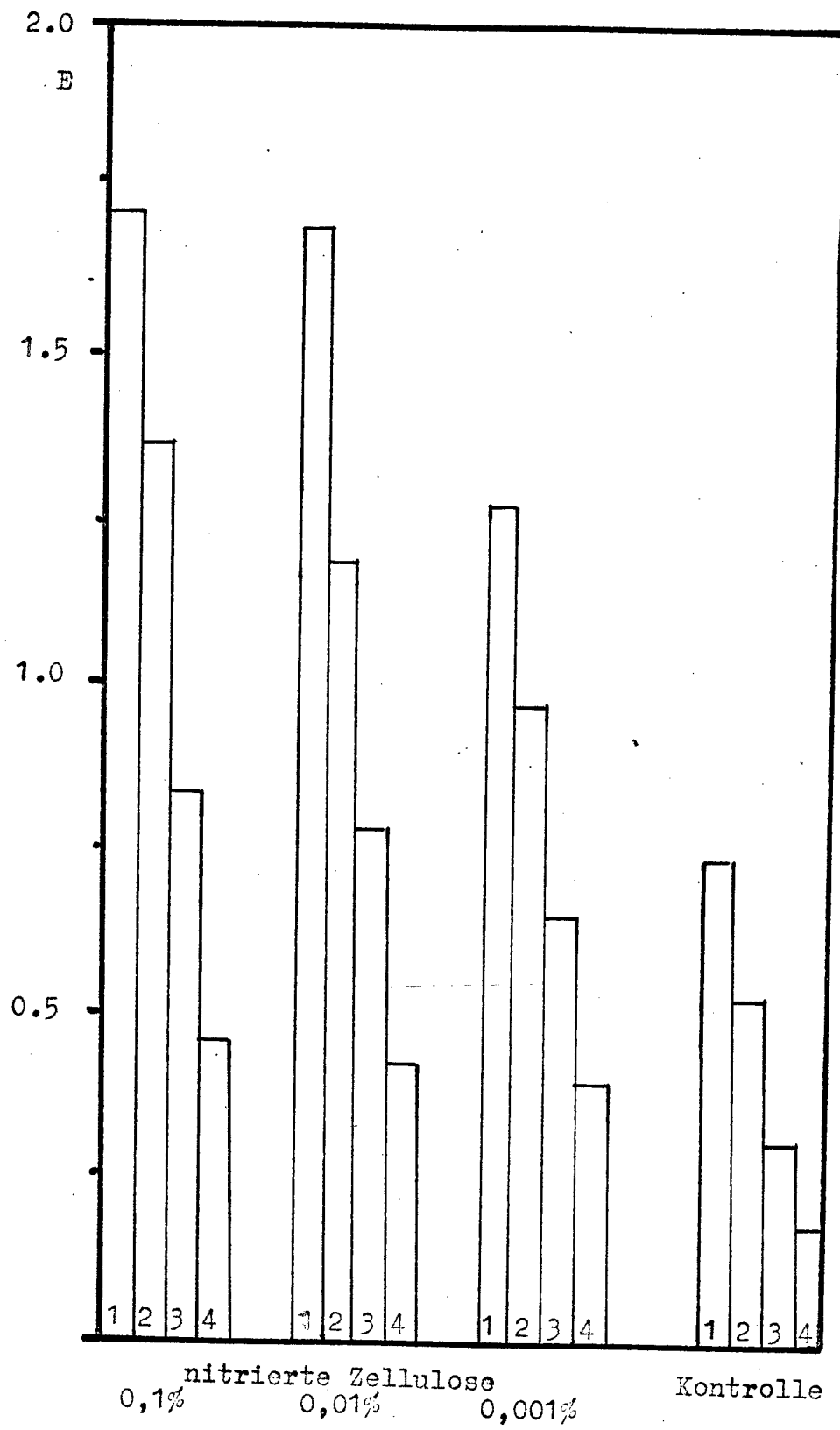
Die Figur 3 zeigt deutlich, daß die sogenannten unspezifischen Reaktionen auf heterologen Antigenen besonders hervortreten, wenn die Träger vorher nicht mit nitrierter Zellulose beschichtet wurden (Kontrollen; rechts in Figur 3). Sie können praktisch vernachlässigt werden, wenn die feste Phase einen dünnen Film von nitrierter Zellulose trägt (nitrierte Zellulose; links in Figur 3).

Beispiel 6

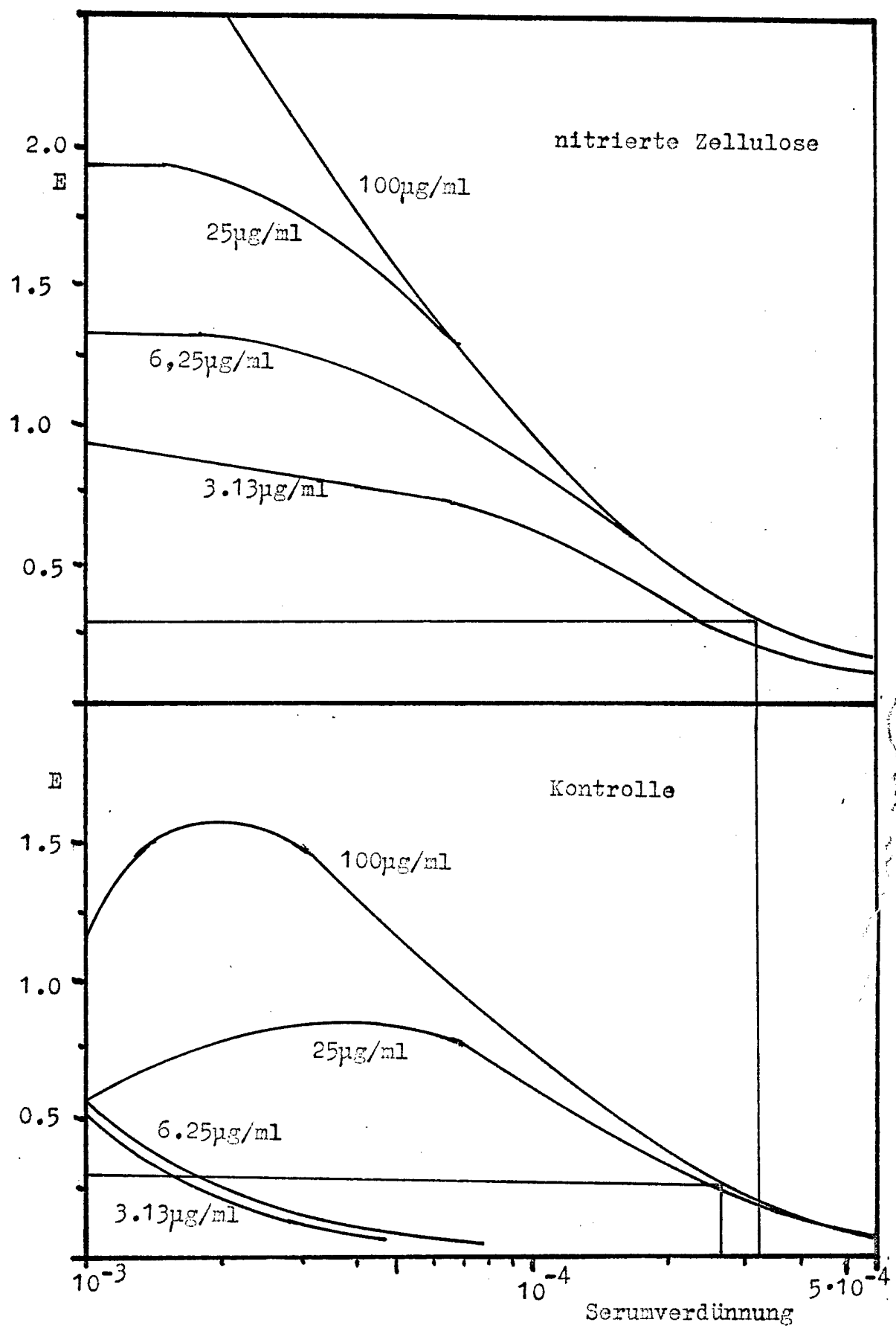
Mit nitrierter Zellulose beladene Träger, an die Antigene oder Antikörper adsorbiert wurden, lassen sich ohne Verlust an Aktivität mindestens 3 Monate in trockenem Zustand verpackt bei +4°C (sehr kühl) aufbewahren.

Beispiel 7

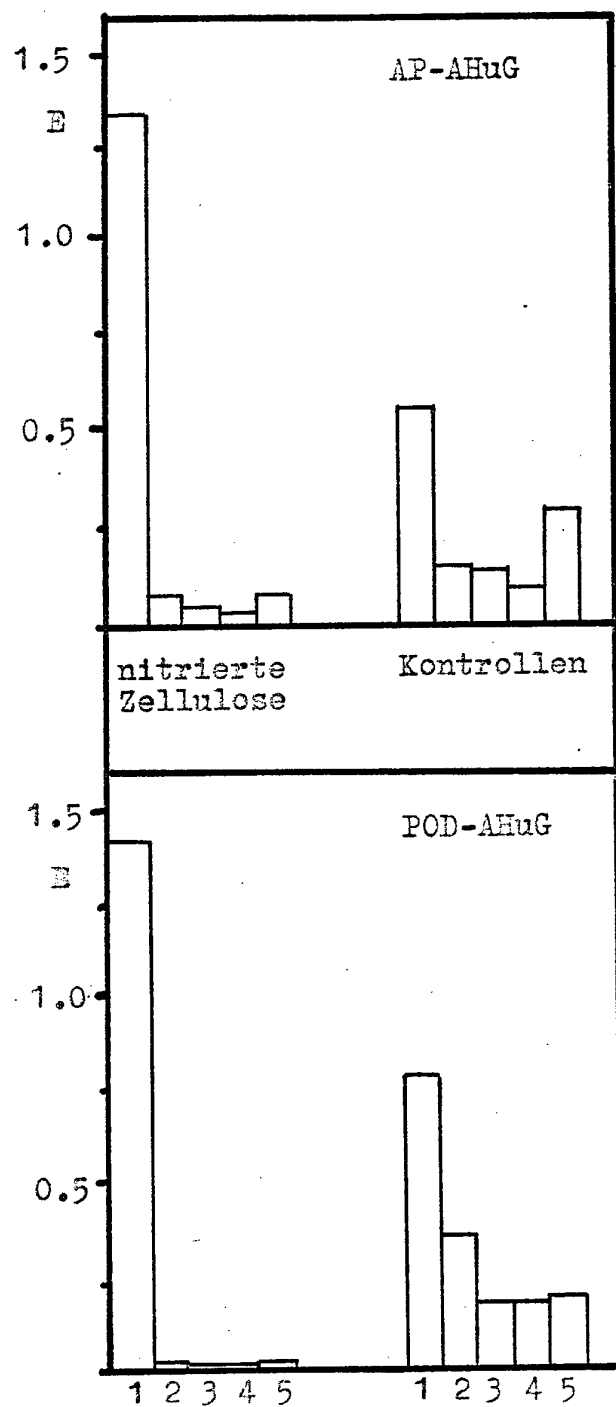
Ähnliche Ergebnisse wie in den unter Beispiel 1 bis 6 beschriebenen lassen sich auch auf Mikrottestplatten anderer Herkunft erzielen. Versuche wurden durchgeführt mit Mikrottestplatten des VEB MLW Polypast Halberstadt, der Flow Laboratories sowie mit Testplatten Dynatech-Microelisa.



Figur 1



Figur 2



Figur 3