



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

241506
(11) (12)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/531

(22) Přihlášeno 30 04 82

(21) [PV 3120-82]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 02 05 81
[67 332/1981] Japonsko

(40) Zveřejněno 22 08 85

(45) Vydáno 15 09 87

[72]

Autor vynálezu

TSUTSUI SATOSHI, YAMATO; SUDO TADAMITSU, SAGAMIHARA;
ITO MICHIO, YOKOHAMA [Japonsko]

[73]

Majitel patentu

MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, TOKYO [Japonsko]

(54) Senzitizované činidlo ve formě částic pro imunologické reakce

1

2

Řešení se týká senzitizovaného činidla ve formě částic pro imunologické reakce, vyznačující se tím, že sestává z nosičů ve formě částic se středním průměrem 0,05 až 1,2 μm , suspendovaných ve vodném prostředí s elektrickou vodivostí 5,0 mS/cm až 0,5 mS/cm, s výhodou 2,6 až 0,5 mS/cm, přičemž částice nosiče jsou senzitizovány antigenem nebo protilátkou.

Vynález se týká senzitivizovaného činidla ve formě částic pro imunologické reakce.

V posledních letech je velmi důležité prokázat v lékařství, biochemii, hygieně a epidemiologii látky, které se vyskytují pouze ve stopách, zejména antigeny a protilátky.

Dříve se k těmto účelům užívala převážně reakce antigenu nebo protilátky s částicemi latexu, které byly senzitivizovány příslušnou protilátkou nebo antigenem na skleněné destičce a pak se pozoroval stupeň shlukování.

Tímto způsobem je však velmi obtížné provést přesné stanovení.

V poslední době byla navrhována modifikace tohoto systému pro antigeny a protilátky při použití senzitivizovaných částic latexu tak, že stupeň poklesu zákalu supernatantu latexu po proběhnutí reakce je možno měřit opticky, takže se využívá skutečnosti, že při reakci antigenu nebo protilátky se senzitivizovaným latexem dochází ke shlukování částic latexu, jak bylo popsáno například v publikacích *Croatia Chemica Acta*, sv. 42, str. 457 až 466 (1970), *Jugoslavia, European Journal of Biochemistry*, sv. 20, č. 4, str. 558 až 560 (1971), *Germany and Immunochimistry*, sv. 12, str. 349 až 351 (1975), U.K. I při takto modifikované metodě se nedosahuje uspokojivých výsledků, zejména pokud jde o přesnost a schopnost reprodukce, takže nová modifikace nebyla uvedena do praxe.

V US-patentovém spisu č. 3 088 875 jsou navrhovány imunologické diagnostické materiály s obsahem částic polystyrolového latexu o středním průměru 0,15 až 0,25 mikrometrů. Prostředek nemá vlastnosti, které by zajišťovaly přesnou reprodukovatelnost a uvedený patentový spis také nikde neuvádí elektrickou vodivost diagnostického materiálu.

US-patentový spis č. 3 658 982 navrhuje stabilní latexové činidlo ke zjišťování rheumatoidní artritidy s latexovými částicemi s vrstvou králičího gamma-globulinu, předem zpracovaného působením papainu, trypsinu nebo chymotrypsinu. Ani tento prostředek nezajišťuje dobrou reprodukovatelnost získaných výsledků, ve spisu se nikde neuvádí vodivost činidla.

Bylo také navrhováno provádět stanovení při použití světla o specifické vlnové délce při použití nosiče, který měl určitý průměr částic, například v US patentu č. 4 118 192.

Dosud známá činidla pro stanovení antigenu a protilátky, která sestávají z jemných částic, senzitivizovaných příslušným antigenem nebo protilátkou mají společnou nevýhodu, že dispergovatelnost takto senzitivizovaných částic se může tak zhoršit, že tyto částice podlehnou nespecifickým aglutinačním reakcím a jejich citlivost a imunoreaktivita se může v průběhu skladování do značné míry měnit, což má opět za následek nepřesnost u omezené možnosti stanovení.

Vynález si klade za úkol vyvinout senziti-

zované činidlo ve formě částic pro imunologické reakce tak, aby toto činidlo bylo prostě uvedených nevýhod, přičemž bylo zjištěno, že kritické je právě prostředí, v němž jsou senzitivizované částice dispergovány.

Předmětem vynálezu je tedy senzitivizované činidlo ve formě částic pro imunologické reakce, vyznačující se tím, že sestává z nosičů ve formě částic se středním průměrem 0,05 až 1,2 μm suspendovaných ve vodném prostředí s elektrickou vodivostí 5,0 mS/cm až 0,5 mS/cm, s výhodou 2,5 až 5,0 mS/cm, přičemž částice nosiče jsou senzitivizovány antigenem nebo protilátkou.

Nosič ve formě částic, který tvoří součást činidla podle vynálezu, je obvykle v podstatě nerozpustný ve vodném prostředí. Tímto nosičem může být jakýkoliv vhodný materiál, například latexy polymerních materiálů jako polystyren, kopolymery styrenu a butadienu, polyakryláty, polymethakryláty, kopolymery akrylonitrilu, butadienu a styrenu, latexy těchto polymerů, aktivované včleněním karboxylové nebo amidové skupiny kopolymerací s kyselinou akrylovou, kyselinou methakrylovou, akrylamidem a podobně, krevní buňky, bakterie, například *Staphylococci* a *Streptococci*, *Serratia mercensens* nebo *Rickettsia*, jakož i fragmenty těchto bakterií.

Střední průměr částic těchto nosičů se pohybuje obvykle v rozmezí 0,05 až 1,2, s výhodou 0,1 až 1,0, zvláště 0,2 až 0,8 μm . V případě, že průměr částic nosiče je příliš velký, snižuje se rozsah možnosti stanovení nebo je nosič nestálý. Na druhé straně nosiče s menším průměrem mají za následek ne hospodárnost při výrobě reakčního činidla a není snadné dosáhnout při jejich použití zlepšené citlivosti. Je tedy zřejmé, že není výhodné užít nosičů s většími nebo menšími částicemi.

Antigeny, které mohou být naneseny na uvedený nosič jsou například bílkoviny, polypeptidy, steroidy, polysacharidy, tukové látky, pyly, prachy, hapteny a podobně. Protilátky zahrnují například bílkoviny, které jsou produkovány při reakci se svrchu uvedenými antigeny.

Koncentrace nosiče ve formě částic se obvykle pohybuje v rozmezí 0,03 až 0,3, s výhodou 0,05 až 0,02 %. Při vyšší koncentraci nosiče je zapotřebí užít komplikovanějšího zařízení ke stanovení, takže se nedosáhne žádné další výhody. Na druhé straně při použití nižší koncentrace není snadné dosáhnout uspokojivé citlivosti a reaktivity.

Nosič ve formě částic je možno senzitivizovat působením antigenu nebo protilátky jakýmkoliv známým způsobem, například fyzikální adsorpcí antigenu nebo protilátky na nosič ve formě částic, chemickou vazbou mezi antigenem nebo protilátkou a částicovým nosičem nebo kombinací těchto způsobů.

Množství antigenu nebo protilátky, které se užije k senzitivizaci nosiče se stanoví v zá-

vislosti na různých faktorech, například na typu určitého antigenu nebo protilátky a na požadované přesnosti stanovení.

Nosič ve formě částic, senzitivizovaný antigenem nebo protilátkou je možno dále stabilizovat použitím vhodného stabilizátoru před uvedením v suspenzi ve vodném prostředí.

Vhodným stabilizátorem pro toto použití jsou aminokyseliny, polypeptidy, bílkoviny a podobně, musí jít o látky, které se neúčastní předpokládané imunologické reakce, nejvýhodněji je sérové albumín. Stabilizátor se užije známým způsobem, dbá se zejména na možnost skladování a stabilitu reakce. Zvláště vhodného účinku se dosahuje v případě, že antigen nebo protilátka jsou fyzikálně adsorbovány na nosiči.

Vodné prostředí, v němž se nacházejí senzitivizované částice nosiče musí mít elektrickou vodivost 5,0 mS/cm nebo nižší s výhodou 2,5, zvláště 1,0 mS/cm nebo nižší. Při vyšší vodivosti je reakční činidlo nestálé, což snižuje přesnost stanovení.

Vodným prostředím může být voda, roztok pufru a podobně, tento roztok může obsahovat ještě další přísady, jako stabilizátory, konzervační látky, chelatační látky, smáčedla a podobně. Z pufrů jsou vhodné pufr s glycinem, s kyselinou fosforečnou, s kyselinou citrónovou, barbitolový pufr, boritanový pufr, pufr s tris(hydroxymethyl)aminomethanem a kyselinou chlorovodíkovou, tris-malátový pufr, pufr s amoniakem a podobně.

Svrchu uvedené stabilizátory jsou obvykle přítomny v koncentraci 0,001 až 1, s výhodou 0,05 až 0,6 %.

Konzervačním činidlem může být zejména azid sodíku a merthiolát.

Chelatačním činidlem může být kyselina ethylendiamintetraoctová, nitrilotrioctová, cyklohexandiamintetraoctová a podobně.

Ze smáčedel jsou vhodná zejména smáčedla neiontového typu.

Vodné prostředí má obvykle pH 5 až 10, s výhodou 6 až 9,5, zejména 6,5 až 8,5. V případě, že vodné prostředí má pH nižší než 5, reakční činidlo je nestálé, přestože citlivost se zvýší. Při použití vodného prostředí o pH vyšším než 10 klesá citlivost a v některých případech i skladovatelnost reakčního činidla.

Nosič ve formě částic, senzitivizovaný antigenem nebo protilátkou se obvykle uvádí v suspenzi ve vodném prostředí v koncentraci 0,01 až 20, s výhodou 0,05 až 10 %. Při nižší koncentraci má výsledné činidlo sníženou stabilitu a jeho použití je omezeno, při vyšší koncentraci stabilita rovněž klesá.

Reakční činidlo podle vynálezu je možno připravit například způsobem, popsáným v následujících příkladech tak, že se částice nosiče senzitivizují antigenem nebo protilátkou známým způsobem a v případě potřeby se uvedou ve styk se stabilizátorem, načež se nosič uvede v suspenzi ve vodném prostředí známým způsobem.

Reakční činidlo podle vynálezu je možno přímo užít nebo je zásobním roztokem pro metody, prováděné na podložním sklíčku nebo ve zkumavce, výsledek je možno odečítat pouhým okem nebo měřit opticky.

Reakční činidlo je vhodné k imunologickým reakcím svrchu uvedeného typu.

V případě potřeby se nejprve reakční činidlo podle vynálezu zředí roztokem pufru k úpravě koncentrace nosiče tak, aby to odpovídalo požadavkům předpokládané imunologické reakce. Vhodná koncentrace závisí na různých faktorech jako je antigen nebo protilátka, koncentrace těchto látek a jejich reaktivita. Tyto závislosti je možno stanovit pokusem. Obecně je možno uvést, že v případě optického měření imunologické reakce je výhodné udržovat konečnou koncentraci nosiče na hodnotě alespoň 0,03, s výhodou 0,05 až 1, zvláště 0,1 až 0,5 hmotnostních %. V případě pozorování pouhým okem je konečná koncentrace 0,05 až 0,8, s výhodou 0,1 až 0,5 hmotnostních %.

Použitým pufr pro ředění může být pufr s glycinem, s boritanem, tris-pufr s kyselinou chlorovodíkovou nebo malátem, amoniakový pufr a podobně.

Použitý pufr má obvykle rozmezí pH 7,6 až 9,6, s výhodou 8,0 až 9,0. Pufr s nižším pH může způsobit aglutinaci a nestálost reakčního činidla, přestože citlivost je zvýšena.

Při vyšším pH se citlivost snižuje a mohou se také nepříznivě měnit vlastnosti při skladování, zejména při vyšší teplotě.

V případě, že výsledek imunologické reakce má být pozorován pouhým okem, smísí se předem stanovené množství reakčního činidla a vzorku s obsahem antigenu nebo protilátky na podložním sklíčku nebo ve zkumavce a pozoruje se aglutinace senzitivizovaných částic.

V případě, že se imunologická reakce měří opticky, smísí se reakční činidlo a vzorek s obsahem antigenu nebo protilátky a měří se změna v prostupnosti světla nebo zákal.

V případě, že se opticky měří prostupnost světla, užije se obvykle světla s větší vlnovou délkou, než je střední průměr částic nosiče, užije se faktoru alespoň 1,1, s výhodou 1,5 a zvláště alespoň 2. Vlnová délka se proto pohybuje obvykle v oblasti 600 až 2 400 nm, s výhodou 800 až 1 800 nm. V případě, že se použije světla s nižší vlnovou délkou, je pro získání dobrých výsledků zapotřebí použít nosiče v dostatečně nízké koncentraci spolu s reakčním činidlem s velmi dobrou dispergovatelností, takže v některých případech je velmi nesnadné dosáhnout dostatečně citlivosti a někdy dojde k porušení celé reakce. Při použití světla s vyšší vlnovou délkou klesá citlivost.

Ke stanovení je možno užít monochromatického nebo polychromatického světla.

Buňka, použitá ke stanovení změn prostupnosti má obvykle tloušťku 0,2 až 10 mm.

Měření propustnosti je možno provádět

tak, že se měří čas, který uplyne do dosažení předem stanovené hodnoty absorbance nebo tak, že se stanoví vzestup absorbance ve stanoveném časovém úseku.

Reakčním činidlem podle vynálezu jsou senzitivované částice a při jejich použití je možno stanovit množství antigenu nebo protilátky v různých vzorcích s dobrou reprodukovatelností a vysokou přesností. Mimoto je činidlo účinné i po zmrazení a rozmrazení a je proto možno je lyofilizovat a znovu užít.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

Globulinová protilátka proti α -fetoproteinu se rozpustí v 0,1 M glycinovém pufru o pH 8,8. Množství molekul protilátky globulinového typu je ekvivalentní 800 až 1 500 na

každou částici latexu o průměru 0,220 μm (Dow Chemical). Roztok se pak smísí se stejným objemem pufru s latexem a glycinem o pH 8,8 při teplotě místnosti za stálého míchání tak, aby došlo k požadované senzitivaci. Po oddělení odstředěním se supernatant odstraní a sraženina se uvede ve styk s příslušným množstvím sérového albumínu skotu. Takto získané senzitivované částice se uvedou v suspenzi v roztoku pufru s elektrickou vodivostí 1,5 mS/cm a s obsahem vhodného množství konzervační látky a získaná suspenze se skladuje. Takto získané reakční činidlo má velmi dobrou přesnost stanovení.

Reakční činidlo se ředí a používá k provádění imunologických reakcí.

Reakční činidlo se zředí glycinovým pufrům o pH 8,6. V následujících tabulkách 1 a 2 jsou uvedeny výsledky při opakovaném stanovení a mimoto výsledky, získané s činidlem, které bylo určitou dobu skladováno.

Tabulka 1

Výsledky při opakovaném stanovení

Číslo opakování	Vzorek séra ng/ml		
	1 (45,0)*	2 (195,6)	3 (950,0)
1	45,2	189,2	906,2
2	41,3	190,5	917,5
3	42,0	195,8	887,5
4	44,5	181,1	901,3
5	44,6	190,5	906,3
6	43,6	189,7	937,1
7	42,5	190,1	885,0
8	42,0	184,5	918,0
9	38,9	180,5	913,5
10	38,6	184,2	925,3
11	40,2	185,6	921,0
12	39,7	190,1	887,2
Průměr	41,9	187,7	908,8
Standardní odchylka	2,26	4,49	16,4
Koeficient variace	5,4 %	2,4 %	1,8 %

* Hodnoty v závorkách jsou výsledky radioimunologického stanovení

Tabulka 2

Stanovení v průběhu delšího období

Číslo	Měsíc/ den 1980	Vzorek séra ng/ml		
		1	2	3
1	2/4	55,3	153,0	530,6
2	2/7	49,2	145,8	517,6
3	3/5	54,3	154,1	542,9
4	3/27	45,5	149,0	464,3
5	4/10	47,5	146,0	483,3
6	5/7	48,5	151,0	500,8
7	5/14	47,8	148,3	478,3
8	5/21	51,8	138,2	507,3
9	6/10	50,3	159,7	512,8
10	6/25	52,1	156,3	521,3
Průměr		50,2	150,1	505,9
Standardní odchylka		3,13	6,12	24,5
Koeficient variace (%)		6,2	4,1	4,9

Příklad 2

Protilátka proti CRP (C-reaktivní bílkovina) se rozpustí v 0,2 M boritanovém pufru o pH 8,8 a částice latexu o průměru 0,220 μm (Dow Chemical) se výsledným roztokem senzitivizují tak, že každá částice nese 800 až 1 800 molekul antigenu. Senzitivizované částice latexu se pak uvedou ve styk se sérovým albumínem skotu a dispergují se v příslušném množství boritanového pufru o vodivosti 4,0 mS/cm. Výsledné reakční činidlo zajišťuje velkou přesnost měření.

Příklad 3

Králičí nebo kozí protilátka proti lidskému fibrinogenu $[\text{F}(\text{ab}')_2]$ se rozpustí v 0,1 M tris-pufu s malátem o pH 8,6 a částice latexu o průměru 0,220 μm (Dow Chemical) se uvedou v suspenzi v témž pufru a jsou takto senzitivizovány, citlivost výsledného reakčního činidla je řádu 100 ng/ml. Částice se pak uvedou ve styk se sérovým albumínem skotu a uvedou v suspenzi ve vodném roztoku s obsahem 0,1 % azidu sodíku, vodivost je 1,0 mS/cm. Při použití se reakční činidlo ředí tris-pufem s malátem o pH 8,4 nebo s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,4 na požadovanou koncentraci latexu a reakce se provádí na podložním sklíčku nebo je možno provádět optické měření bez ředění reakčního činidla. Při reakci na podložním sklíčku je možno při použití tohoto reakčního činidla snadno odlišit, zda došlo nebo nedošlo k aglutinaci.

Příklad 4

Kozí protilátka globulinového typu proti lidskému IgG se rozpustí v 0,1 M tris-pufu s malátem o pH 8,8 a tímto roztokem se senzitivizují částice latexu o průměru 0,312 μm (Dow Chemical), suspendované v toméž pufru. Senzitivizované částice se pak uvedou

ve styk se sérovým albumínem skotu a nakonec se uvedou v suspenzi ve vodném roztoku s vodivostí 3,0 mS/cm. Při použití se suspenze ředí 0,1 M tri-pufu s malátem nebo kyselinou chlorovodíkovou na požadovanou koncentraci nebo se suspenze užívá bez dalšího ředění.

Příklad 5

Králičí protilátka $\text{F}(\text{ab}')_2$ proti lidskému IgA se rozpustí v 0,2 M boritanovém pufru o pH 8,3 a roztok se zpracovává stejně jako v příkladu 4 za vzniku požadovaného reakčního činidla s tím rozdílem, že vodný roztok, užitý ke konečnému ředění má vodivost 0,5 až 0,8 mS/cm.

Příklad 6

Částice latexu se senzitivizují vysoce čištěnou králičí protilátkou proti lidskému IgM v glycinovém pufru o pH 9,6. Kvantitativní vztahy se mění v závislosti na kvalitě protilátky a na požadované citlivosti. Pak se senzitivizované částice uvedou ve styk s příslušným množstvím sérového albumínu skotu, načež se uvedou v suspenzi ve vodném roztoku s vodivostí 1,2 mS/cm, který popřípadě obsahuje přibližně 0,05 % sérového albumínu skotu, čímž se získá výsledné reakční činidlo.

Příklad 7

Vysoce čištěná králičí protilátka $\text{F}(\text{ab}')_2$ proti lidskému CG se rozpustí v 0,2 M tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,6 a výsledný roztok se užije k senzitivizaci částic latexu o průměru 0,220 μm (Dow Chemical) v suspenzi v toméž pufru při teplotě místnosti. Pak se částice uvedou ve styk s příslušným množstvím sérového albumínu skotu a pak se senzitivizované částice uvedou

v suspenzi ve vodném roztoku s vodivostí 0,8 mS/cm a výsledné čínidlo se skladuje.

Vynález byl popsán v souvislosti s několika konkrétními provedeními, je však zcela

zřejmé, že je možno provést ještě celou řadu změn a modifikací, které budou stále spadat do oboru vynálezu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Senzitizované čínidlo ve formě částic pro imunologické reakce, vyznačující se tím, že sestává z nosičů ve formě částic se středním průměrem 0,05 až 1,2 μm , suspendovaných

ve vodném prostředí s elektrickou vodivostí 5,0 mS/cm až 0,5 mS/cm, například 2,5 až 0,5 mS/cm, přičemž částice nosiče jsou senzitivovány antigenem nebo protilátkou.