Octrooiraad

(12)A **Terinzagelegging** (11) **8703102**

Nederland (19) **NL**

(54) **Werkwijze voor het aantonen van anti-P. falciparum sporozoiet antilichamen in menselijk bloed.**

(51) Int.Cl⁴.: G01N 33/569.

(71) Aanvrager: Eniricerche S.p.A. te Milaan, Italië.

(74) Gem.: Ir. J.A. van der Veken c.s.
OCTROOI- EN MERKENBUREAU VAN EXTER
Willem Witsenplein 3-4
2596 BK 's-Gravenhage.

(21) Aanvrage Nr. 8703102.

(22) Ingediend 22 december 1987.

(32) Voorrang vanaf 23 december 1986.

(33) Land van voorrang: Italië (IT).

(31) Nummer van de voorrangsaanvrage: 2281786 .

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 18 juli 1988.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Korte aanduiding: Werkwijze voor het aantonen van anti-P. falciparum sporozoiet antilichamen in menselijk bloed

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een nieuwe immuno-enzymatische werkwijze voor de diagnose van malaria in menselijk bloed.

Meer in het bijzonder heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een werkwijze voor het aantonen en bepalen van anti-P. falciparum sporozoiet antilichamen in menselijk bloed, serum en/of plasma.

Malaria vormt één van de ernstigste parasitaire ziekten en treft elk jaar honderden miljoenen personen, vooral, in de tropische gebieden van Azië, Afrika en Amerika en veroorzaakt een hoge kindersterfte.

Het etiologisch agens van malaria is een protozo die behoort tot de soort Plasmodium, welke overgebracht wordt op de mens door de beet van Anopheles mosquito.

Van de honderden soorten Plasmodium die in de natuur voorkomen, zijn er slechts vier pathogeen voor de mens: Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Plasmodium vivax en Plasmodium falciparum.

Vooral deze laatstgenoemde vormt de meest diffuse soort en veroorzaakt de meeste ziekte en sterfte tengevolge van malaria.

Het aantonen van antisporozoiet antilichamen in bloed van personen die verdacht worden aan malaria te lijden vormt een wezenlijke klinische grootheid voor de diagnose van malaria en het vaststellen van de werkzaamheid van een antimalaria vaccin.

In het algemeen wordt de diagnose van malaria-infecties uitgevoerd door bloed onder het microscoop te onderzoeken, of met behulp van immunologische werkwijzen die berusten op fluorescentiebepalingen (IFA) radio-activiteitsbepalingen (IRMA) en enzymatische werkingsbepalingen (EIA).

De microscopische analyse van bloed is echter moeilijk en ongeschikt voor een epidemiologisch onderzoek, waarbij honderden

van duizenden monsters onderzocht moeten worden.

Ook de immunologische methoden IRMA en IFA geven geen geschikte resultaten, terwijl zij naast de noodzaak van lange bewerkingstijden, gecompliceerd worden door de vele noodzakelijke stappen en door het gebruik van voor de mens instabiele en schadelijke stoffen.

Van de EIA immuno-enzymatische methoden, is de meest gebruikte de ELISA (enzym-gebonden-immuno-absorberende-proef) proef, die bestaat uit:

a) fixeren, door absorptie, of door een covalente chemische binding, van een natuurlijk of synthetisch antigeen aan een vaste drager;

b) blokkeren van de resterende plaatsen op de drager door een geschikt eiwit;

c) incuberen van het aan de drager gebonden antigeen met het onderzochte serum, en

d) achtereenvolgens toevoegen van anti-menselijk immunoglobuline antilichaam gebonden aan een aantonend enzym, en een kleurloos substraat voor het enzym dat, in geval van een positieve reactie van het serum, een gekleurd produkt geeft.

Deze proef, hoewel men hierbij bepaalde nadelen van de IRMA en IFA methoden kan ondervangen, door gebruik te maken van stabiele en niet radio-actieve stoffen, vereist echter langere bewerkingstijden (ongeveer 6 uren) en het gebruik van reactiemiddelen, zoals anti-immunoglobuline antilichamen-enzym, die slechts verkregen kunnen worden met behulp van complexe en dure methoden.

Er is derhalve op dit gebied een sneller, goedkope en gevoelige diagnostische methode gewenst, die geschikt is voor een op grote schaal toepassen in gebieden waar malaria endemisch is, of in gebieden waar een nauwkeurige controle uitgevoerd moet worden om infectiebronnen te voorkomen en te lokaliseren.

Aan deze eis wordt volgens de uitvinding voldaan, door middel van een nieuwe immuno-enzymatische methode die werkt met een synthetisch antigeen-enzym conjugaat dat met de anti-

sporozoiet antilichamen een stabiel antilichaam-antigeen-enzym-complex kan vormen, en met de eiwitten die zich sterk binden aan het antisporozoiet antilichaam van dit complex.

Een doel van de onderhavige uitvinding is derhalve een immuno-enzymatische werkwijze voor het aantonen en bepalen van anti-P. falciparum sporozoiet antilichamen in monsters van menselijk bloed en/of van zijn produkten, omvattende:

incuberen van deze monsters in aanwezigheid van een synthetisch antigeen-enzym conjugaat dat met antisporozoiet antilichamen een stabiel antilichaam-synthetisch antigeen-enzym-complex kan vormen; binden van het antisporozoiet antilichaam van dit complex met de eiwitten die geadsorbeerd zijn op, of covalent gebonden aan, een vaste drager, en, tenslotte, bepalen van de enzymatische werking van het aan de eiwitten gebonden complex door toevoegen van een kleurloos enzymatisch substraat dat in geval van een positieve reactie, een gekleurd produkt geeft.

Een ander doel van de onderhavige uitvinding is het gebruik van dit synthetisch antigeen-aantonend enzym conjugaat voor het samenstellen van een samenstel voor de diagnose van malaria.

Andere doeleinden van de onderhavige uitvinding zullen duidelijk worden uit de beschrijving en uit de voorbeelden.

Het voor de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding geschikte synthetische antigeen-enzym conjugaat wordt gevormd door een een reeks vormend polypeptide, dat de antisporozoiet antilichamen kan herkennen en binden, en door een enzym.

In het bijzonder is volgens de onderhavige uitvinding het een reeks vormend polypeptide het $(Asn\text{-}Ala\text{-}Asn\text{-}Pro)_n$, waarin n een waarde bezit tussen 3 en 40, bij voorkeur van 10 tot 20, en het polypeptidesegment van het natuurlijk circumsporozoiet-eiwit van het membraan van het sporozoiet van P. falciparum nauwkeurig reproduceert.

De aanwezigheid in dit polypeptide van slechts twee eindstandige functionele chemische groepen, NH_2 en COOH, maakt dit bijzonder geschikt voor de bereiding van het conjugaat volgens de onderhavige uitvinding, daar men hierdoor een stabiele co-

valente binding kan vormen tussen het polypeptide en het enzym, zonder nadelige beïnvloeding van de katalytische werking van dit enzym.

Dit polypeptide wordt in zuivere vorm en in hoge opbrengst bereid volgens de werkwijze beschreven in Europese octrooiaanvrage gepubliceerd onder nr. 209 643 door polymerisatie van HCl.H-Asn-Ala-Asn-Pro-OPCP polypeptide, in een inert polaire oplosmiddel, in tegenwoordigheid van een organische tertiaire base.

Voor de bereiding van het conjugaat volgens de onderhavige uitvinding geschikte enzymen worden gekozen uit die welke kunnen inwerken op een chromogeen substraat. Voorbeelden van dergelijke enzymen zijn peroxydase, α-galactosidase en alkalifosfatase. Bij voorkeur wordt peroxydase gebruikt.

Volgens de onderhavige uitvinding wordt het synthetisch antigeen-enzym conjugaat bereid door middel van een werkwijze omvattende:

1) het oxyderen van het gezuiverde enzym in een 0,1 M $NaHCO_3$ oplossing, zoals, bijvoorbeeld natriummetaperiodaat, bij kamertemperatuur (20-25°C) in het donker, gedurende ongeveer 2 uren;
2) toevoegen aan deze oplossing van het polypeptide opgelost in $NaHCO_3$ (pH 9,2) in een polypeptide/enzym molaire verhouding van ongeveer 40/1, en houden van de bij kamertemperatuur weggezette verkregen oplossing, in het donker, gedurende ongeveer 16 uren;
3) toevoegen aan de verkregen oplossing van een reduceermiddel zoals bijvoorbeeld $NaBH_4$, en, tenslotte
4) afscheiden van het polypeptide-enzym conjugaat.

In het bijzonder wordt volgens een praktische uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding een conjugaat bereid waarin het polypeptide $(Asn-Ala-Asn-Pro)_{17}$ en het enzym peroxydase is. De conjugatiegraad, d.w.z., de molaire verhouding van polypeptide ten opzichte van enzym in dit conjugaat bedraagt 0,9-0,92, dicht bij de verwachte waarde (1) voor het zuivere conjugaat.

De specifieke werking van peroxydase, bepaald door spectrofotometrie bij 405 nm zoals beschreven voor H. Galloti (1979), J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 1-7, bedraagt 75% van die van het geconjugeerde enzym.

Volgens de werkwijze van de onderhavige uitvinding wordt dit conjugaat ongeveer 20-30 minuten geïncubeerd, in een bufferoplossing, met een monster van volledig menselijk bloed, menselijk serum of menselijk plasma.

Het reactiemengsel wordt daarna 20-30 minuten geïncubeerd op een vaste drager waarop het A eiwit geadsorbeerd en/of covalent gebonden wordt.

Dit eiwit staat bekend om zich sterk te binden aan menselijke immunoglobulinen, behoudens IgM en IgG_3, en vormt derhalve met het aan het antigeen-enzym conjugaat gebonden antisporozoiet antilichaam een stabiel complex.

Geschikte vaste dragers voor de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding zijn polysaccharidematerialen zoals cellulose en agarose, en kunststoffen.

Aan het einde van de reactie, en na geschikte wasbewerkingen, wordt aan de mengsels een oplossing toegevoegd, die het chromogeen enzymatisch substraat en H_2O_2 bevat, en na 2-3 minuten wordt de kleurontwikkeling waargenomen.

Als geheel bloed geanalyseerd wordt, wordt het aanvangsmonster, alvorens dit toe te voegen aan het A eiwit gecentrifugeerd of gefiltreerd om de gesuspendeerde stof te verwijderen.

De drempelwaarde, d.w.z. de minimale hoeveelheid positief serum dat een kleurontwikkeling geeft die zichtbaar is met het blote oog bedroeg respectievelijk 0,1 µl en 0,4 µl, voor twee onderzochte sera.

Er wordt bovendien geen kleurontwikkeling waargenomen in de blanco, die bestaat uit het het conjugaat-bevattende mengsel, zonder het monster van bloed en/of van zijn produkten, met serum en plasma van gezonde personen, met al dan niet gehemolyseerd, volledig bloed van niet aan malaria lijdende personen en met γ-globulinen (Globuman - Bern).

Dit geeft een volledige afwezigheid aan van storingen bij

de werkwijze volgens de uitvinding.

De mogelijkheid om snel te kunnen werken, ongeveer 60 minuten, in vergelijking tot de 6 uren die nodig zijn voor de ELISA proef, en het gebruik van een klein aantal reactiemiddelen, d.w.z. alleen het antigeen-enzym en de eiwitten, vormt een bijzonder voordeel van de werkwijze volgens de uitvinding.

Een bijzonder voordeel van deze werkwijze bestaat bovendien in de mogelijkheid van het aantonen en bepalen van anti-sporozoiet antilichamen in volledig bloed. Dit is een gevolg van de grote stabiliteit van het conjugaat volgens de uitvinding in vergelijking met de in bloed aanwezige proteasen.

De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding is bovendien absoluut specifiek daar alle monsters die positief bleken bij IRMA, IFA en ELISA proeven, bij analyse volgens de onderhavige werkwijze, ook een positieve uitslag te zien gaven.

De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding is bijzonder geschikt voor een epidemiologisch onderzoek van malaria en, in het bijzonder, voor het op grote schaal onderzoeken van malaria-infecties in gebieden waar sanitaire voorzieningen ontbreken.

De volgende voorbeelden lichten de uitvinding toe zonder haar echter te beperken.

Voorbeeld 1

Bereiding van $(Asn\text{-}Ala\text{-}Asn\text{-}Pro)_{17}$-peroxydase conjugaat

Peroxydase-enzym (Sigma) werd gezuiverd en gedroogd uit de bevroren toestand alvorens het te conjugeren met het peptide.

10 mg zuiver enzym (E) werd daarna opgelost in 1 ml 0,1 M $NaHCO_3$ en geoxydeerd met 1 ml 16 mM $NaIO_4$ (natriummetaperiodaat), bij kamertemperatuur (20-25°C), in het donker, gedurende 2 uren.

Aan het einde van deze periode werd aan het reactiemengsel 1 ml $NaHCO_3$ (pH 9,2) toegevoegd dat 70 mg $(Asn\text{-}Ala\text{-}Asn\text{-}Pro)_{17}$ peptide (P) bevatte in een molaire verhouding van peptide/enzym van 40/1.

Het aldus verkregen mengsel werd kwantitatief overgebracht in een Pasteur pipet, die aan zijn einde afgesloten was met glaswol, en hieraan werd 500 mg Sephadex(R) G-25 (Pharmacia

Uppsala) poeder toegevoegd; de pipet liet men vervolgens nog 16 uren, in het donker, bij kamertemperatuur staan.

Aan het uit de pipet afkomstige reactiemengsel werd 150 µl 0,1 mM NaOH toegevoegd, die 5 mg/ml $NaBH_4$ bevatte en, 30 minuten later, werd hieraan 450 µl van dezelfde oplossing toegevoegd.

Na ongeveer 1 uur werd het mengsel dat het enzym-peptide conjugaat (E-P) en het niet omgezette peptide (P) en enzym (E) bevatte, in evenwicht gebracht met 5 mM natriumacetaatbuffer, pH 4,4, in een Sephadex G-10 kolom, die vooraf in evenwicht gebracht is met dezelfde buffer. Het mengsel werd vervolgens gebracht op een kolom (0,9 x 10 cm) van carboxymethyl-cellulose (CM-cellulose) in evenwicht gebracht met 5 mM natriumacetaatbuffer, pH 4,4, en geëlueerd met 65 mM natriumacetaatbuffer, pH 4,4, en ontzout op een met gedestilleerd water in evenwicht gebrachte Sephadex G10 kolom. Het eluaat dat de E-P verbinding, en het niet omgezette enzym bevatte werd gedroogd uit de bevroren toestand.

Het niet omgezette peptide werd vooraf geëlueerd met de belastingsbuffer en zijn aanwezigheid werd bepaald door infraroodspectroscopie.

De verkregen resultaten gaven eenzelfde spectrum te zien voor het geëlueerde peptide en voor het als uitgangsmateriaal gebruikte peptide. Hierdoor kon men vaststellen dat tijdens de conjugeringsreactie in het peptide geen wijzigingen waren opgetreden en dat het aan het enzym gebonden peptide derhalve niet beschadigd was.

De mate van E-P conjugering d.w.z., de molaire verhouding van het peptide ten opzichte van het enzym in het conjugaat werd bepaald door berekening van de toename aan Asn, Ala en Pro aminozuurresten in het mengsel dat E-P + vrij E bevat met betrekking tot het oorspronkelijke enzym E.

De analyse van de aminozuren werd uitgevoerd, na 24 uren zure hydrolyse van E-P + E en E met 6N HCl bij 100°C, in afgesloten ampullen met behulp van een Beckman automatische aminozuuranalysator.

Daar de aminozuursamenstelling van de twee peroxydase isoenzymen (B en C) die aanwezig zijn in het oorspronkelijke E, bekend is (Shannan L.M. et al., 1966, J. Biol. Chem. 241, 2, 166) was het mogelijk om voor een E:P molverhouding van 1, overeenkomende met zuiver E-P conjugaat, een theoretische toename aan Asp, Ala en Pro te berekenen van 63%, 68% respectievelijk 100%.

Voor de bovengenoemde aminozuren werden toenamen van 58%, 62% en 90% gevonden, die overeenkomen met een E:P molverhouding van 0,90-0,92 die vrijwel gelijk is aan de berekende verhouding voor het zuivere conjugaat.

De resterende specifieke werking van aan het peptide gebonden peroxydase enzym, bepaald door spectrofotometrie bij 405 nm met 1,7 nM ABTS (2,2'-azino-di(3-ethylbenzothiazolylsulfonzuur) en 0,83 mM H_2O_2 in 50 mM fosfaatbuffer, pH 6,0 (H. Gallati, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 1-7, 1979) bedroeg vrijwel 75% van die van het oorspronkelijke enzym.

Voorbeeld 2

Voor deze proef werden 8 sera van aan malaria lijdende personen, het geheparineerde plasma van vier gezonde donors, het serum van 3 gezonde personen en een monster van volledig bloed van een aan malaria lijdende persoon gebruikt, door, in een 1:1 volumeverhouding, het malaria bevattende serum te mengen met het gehemolyseerde en niet-gehemolyseerde volledig bloed van een gezonde persoon.

Aan 100 µl 10 mM fosfaatbuffer, pH 7,5, die 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20 (PBS-T) en 200 ng E-P conjugaat bevat werd: 1 tot 5 µl bloed, of plasma, of serum van gezonde personen; of 10 µl PBS-T die respectievelijk 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 µl serum van aan malaria lijdende personen bevatte, toegevoegd.

De oplossing liet men 15-20 minuten bij kamertemperatuur staan.

In geval van volledig bloed, werd de oplossing gecentrifugeerd, of gefiltreerd, om de gesuspendeerde stof te verwijderen.

Daarna werden deze oplossingen overgebracht in kleurloze en doorzichtige micropipet einden van kunststofmateriaal die aan hun einde, glaswol bevatten en, daarop, een bed bestaande uit een hoeveelheid van ongeveer 6 µl A eiwit-Sepharose CL4B (Pharmacia Uppsala) vooraf gewassen met PBS-T.

De oplossingen liet men door zwaartekracht 20-30 minuten percoleren, waarna de microkolommen 3 maal gewassen werden met steeds 200 µl PBS-T en twee maal met steeds 200 µl PBS (buffer zonder Tween-20).

Daarna werd aan elke microkolom 200 µl toegevoegd van een substraatoplossing van 4-chloor-1-naftol (Biorad) en H_2O_2, bereid door mengen, op het tijdstip van gebruik, van 1 volumedeel 4-chloor-1-naftol (Biorad) (3 mg/ml in koude methanol) en 5 volumedelen van een oplossing van 6 µl 30%'s H_2O_2 (v/v) toegevoegd aan 10 ml PBS. Na 2-3 minuten werd de ontwikkeling waargenomen van een donkerblauwe kleur bij de positieve monsters.

De drempelwaarde, d.w.z. de minimale hoeveelheid positief serum die een gemakkelijk zichtbare blauwe band te zien geeft, bleek 0,1 µl - 0,4 µl voor de twee onderzochte positieve sera te bedragen.

De specificiteit van de proef werd vastgesteld bij een positief serum van een aan malaria lijdende persoon (ontwikkeling van een blauwe band met E-P), onder gebruik in een proef van 200 ng vrij enzym zonder E-P; in een andere proef werd een grote overmaat (3 µg) (ongeveer 100 maal) vrij P gebruikt in concurrentie met het aanwezige E-P conjugaat (200 ng).

Aan het einde van de reactie werd geen kleurontwikkeling waargenomen.

Voorts werd geen kleurontwikkeling waargenomen in de microkolom voor de blanco, gevormd door het reactiemengsel E-P zonder toevoegen van bloed, serum of plasma; voor het serum of plasma van gezonde personen; voor het gehele bloed van niet aan malaria lijdende personen; of voor menselijke γ-globulinen (Globuman - Bern) die onderzocht werden in een hoeveelheid overeenkomende met ongeveer 6 µl serum.

Dit toont de volledige afwezigheid van storingen bij de

proef waarbij gebruik gemaakt wordt van E-P conjugaat.

De stabiliteit van het aan het peptide (E-P) gebonden peroxydase-enzym werd spectofotometrisch bepaald, door onttrekken van monsters, op tijdstippen van 0 tot 2 uren, uit een oplossing van PBS-T (100 µl) die 200 ng E-P bevat, waaraan monsters serum of plasma toegevoegd waren.

Na 2 uren gaven de verkregen resultaten een ongewijzigde peroxydasewerking te zien.

8703102

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het aantonen en bepalen van anti-P. falciparum sporozoiet antilichamen in monsters van menselijk bloed en/of de verbindingen daarvan, m e t h e t k e n m e r k dat:

a) deze monsters geïncubeerd worden met een synthetisch antigeenenzymconjugaat dat met in het monster aanwezige antisporoziet antilichamen een stabiel antilichaam-synthetisch antigeen-enzymcomplex kan vormen, zonder inactivering van de enzymatische werking;

b) het antilichaam van dit complex gebonden wordt aan de eiwitten die geadsorbeerd zijn door, en/of chemisch gebonden aan een vaste drager, en, tenslotte,

c) de enzymatische werking van het aan de eiwitten gebonden complex bepaald wordt door toevoegen van een kleurloos enzymatisch substraat dat, in geval van een positief resultaat, een gekleurd produkt kan vormen.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k dat het synthetisch antigeen het een reeks vormend polypeptide:

$$(Asn\text{-}Ala\text{-}Asn\text{-}Pro)_n$$

is waarin n een waarde bezit van 3 tot 40 en het eiwit A eiwit is.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, m e t h e t k e n m e r k dat n ligt tussen 10 en 20.

4. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k dat het enzym gekozen is uit de groep bestaande uit de enzymen die met een specifiek substraat een colorimetrische reactie geven.

5. Werkwijze volgens conclusie 4, m e t h e t k e n m e r k dat het enzym peroxydase en/of alkalifosfatase is.

6. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k dat het conjugaat bereid wordt door, in homogene fase

in $NaHCO_3$, bij kamertemperatuur (20-25°C), in het donker, het geoxydeerde enzym te laten reageren met een molaire overmaat $(Asn-Ala-Asn-Pro)_n$ polypeptide, waarin n de bovengenoemde betekenis bezit.

7. Werkwijze volgens conclusie 6, m e t h e t k e n m e r k dat de molaire verhouding van het polypeptide ten opzichte van het enzym in het conjugaat gelijk is aan, of vrijwel gelijk is aan, 0,92.

8. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k dat in de stap (a) de reactie uitgevoerd wordt bij kamertemperatuur (20-25°C) gedurende een reactietijd van 15 tot 20 minuten.

9. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k dat de vaste drager een polysaccharide of kunststofmateriaal is.

10. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k dat polysaccharidedragers cellulose, agarose en dergelijke zijn.

11. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k dat in de stap (b) de reactie uitgevoerd wordt bij kamertemperatuur (20-25°C), gedurende een reactietijd van 20 tot 30 minuten.

12. Diagnostisch samenstel voor het aantonen en bepalen van anti-P. falciparum sporozoiet antilichamen m e t h e t k e n m e r k dat het in conclusie 1 omschreven synthetisch antigeen-enzymconjugaat, en eiwitten, gebruikt worden.