

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 162909 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3543/85

(51) Int.Cl.5

G 01 N 33/544

(22) Indleveringsdag: 05 aug 1985

(41) Alm. tilgængelig: 07 feb 1986

(44) Fremlagt: 23 dec 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 06 aug 1984 US 638596

(71) Ansøger: *Technicon Instruments Corporation; 511 Benedict Avenue; Tarrytown; New York 10591, US

(72) Opfinder: Syed Iftikhar *Ahmad; US, Eddie *Hedaya; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af en analyt-ligand i en prøve og reagens til anvendelse ved fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 4367/81, 5195/83

(57) Sammendrag

3543-85

Reagensmiddel til bestemmelse af en ligand i en analyseprøve omfatter (a) et koblingsmiddel for liganden, (b) et detektionssystem, som har mindst to komponenter, (c) en selektivt tilgængelig blære med en i overfladen inkorporeret ligand eller ligand-analog og en første komponent af detektionssystemet deri, (d) et stof, der modificerer blære-tilgængeligheden ved respons til binding af den i overfladen inkorporerede ligand eller ligand-analog og koblingsmidlet, (e) mindst endnu en komponent af detektionssystemet, som er reaktiv med den første komponent til dannelse af et detekterbart respons, og (f) mindst ét overfladeaktivt stof, som ikke modificerer blære-tilgængeligheden. Midlet og fremgangsmåden ifølge opfindelsen egner sig til anvendelse i forbindelse med automatiserede analyseapparater, herunder af den kontinuerlige strømningstype.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af en analyt-ligand i en prøve som angivet i indledningen til krav 1. Endvidere angår opfindelsen et reagens til anvendelse ved fremgangsmåden.

Mange egenskaber ved naturlige cellemembraner kan duplikeres i et simpelt bilags-lipidsystem, der omtales som liposomer. En af disse egenskaber er lyse. Når en vesikulær, f.eks. liposom, membran indeholder et ydre tilgængeligt antigen, vil det reagere med det tilsvarende antistof og derved undergå en agglutinerings. Når det antigen-sensibiliserede liposom reagerer med det tilsvarende antistof i nærværelse af et komplement, bliver membranen irreversibelt nedbrudt og kan ikke længere fungere som en intakt selektiv permeabilitetsbarriere. Dette er immunolysis.

Graden af immunolyse er blevet styret ved anvendelse af antigen-sensibiliserede liposomer indeholdende en vilkårlig af vidt forskellige fikserede markeringsmolekyler, der frigives ved immunolyse. Se Hixby, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 64: 290-295 (1969); Kinsky et al., Biochemistry, 8: 4149-4158 (1969); Kinsky et al., Biochemistry, 9: 1048 (1970). Se også Six, et al., Biochemistry, 13: 4050 (1974); Uemura et al., J. Biochem, 87: 1221 (1980); og Uemura, et al., J. Immunol. Methods. 53: 221-232 (1982).

Man har tidligere foreslået specifikke analysesystemer, hvorved man benytter en blære, såsom et liposom, med en multilags-lipidmembran, som er fremstillet eller behandlet til opnåelse af overfladebundet ligand eller ligand-analog og en markør eller et reagens, indeholdt i blæren. De resterende reagenser for analysen omfatter: (1) en bindingspartner, for liganden, f.eks. et antistof, og (2) et komplement til opnåelse af lyse af liposomet ved bin-

ding af bindingspartneren til overflade-bundet ligand. McConnel, U.S.A. patentskrift nr. 3 850 578 og McConnel, et al., U.S.A. patentskrift nr. 3 887 698 og Gregoriadis, et al., Liposomes in Biological Systems, John Wiley & Sons, N.Y. (1980), især kapitel 12 med titlen "Liposomes as Diagnostitic Tools" har generelt beskrevet immunoanalyse-systemer, hvorved der er foreslået anvendelsen af enzym-indkapslede liposomer. I U.S.A. patentskrift nr. 4 235 792 er beskrevet en anden homogen immunoanalyse-metode, hvorved der benyttes immunolyse af et antigen-sensibiliseret liposom indeholdende en markør. Blandt de omtalte markører en enzymer (spalte 6, linie 24-28).

I talrige referencer i litteraturen er anvendt forskellige overfladeaktive midler til opnåelse af kemisk lyse af liposomer. Dette er baseret på den erkendte effekt ved sådanne overfladeaktive forbindelser på lipider og integriteten af lipid-holdige membraner. Overfladeaktive midler er blevet anvendt til at lyse liposomer ved udvikling og karakterisering af immunoanalyser, således som ovenfor beskrevet, se f.eks. U.S.A. patentskrift nr. 4 342 836 og de her citerede referencer. En anden og væsentlig forskellig type liposom-immunoanalyse er beskrevet i U.S.A. patentskrift nr. 4 713 324. I denne er også beskrevet anvendelsen af overfladeaktive stoffer til at nedbryde liposomer.

Ved mange automatiske analysemetoder, herunder af kontinuerlig type, kræves tilstedeværelsen af overfladeaktive stoffer i reagens-blandingerne til opnåelse af passende hydrodynamiske og optiske egenskaber for væskerne, der skal analyseres. Ved kendt teknik er der ikke taget hensyn til disse modstridende begrænsninger for liposom-specifik bindingsanalyse og kravene til automatiserede analysesystemer.

Liposom-specifik bindingsanalyser åbner nye muligheder for diagnose in vitro. Tilpasning af homogene immunoanalyser til automatiseret klinisk kemi er blevet overordentligt attraktivt. Det er især stærkt ønsket at udnytte homogene immunoanalyse-metoder på kontinuerle strømningsystemer. I modsætning til tidligere kendt teknik er der ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebragt liposomholdige reagenser, der kan udnyttes i automatiserede analyseapparater, herunder kontinuerlige strømningsystemer. En særlig kritisk komponent ved disse opskrifter er overfladeaktive stoffer, der er kompatible med liposomer (dvs. ikke lyser eller på anden måde mobilisere disse).

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 anførte, er det mulig at udføre immunoanalyser af et bredt spektrum af prøver uden nødvendigheden af en operatør og uden risiko for sammenblanding af forskellige prøver.

Fremgangsmåden kan udføres i forbindelse med væskeformige prøver af forskellig art, herunder biologiske, fysiologiske, industrielle, miljømæssige og andre typer væsker. Af særlig interesse er biologiske væsker, såsom serum, plasma, urin, cerebrospinal væske, saliva, mælk, gæringsvæske og andre dyrkningsmedier og supernatanter samt fraktioner af en vilkårlig heraf. Andre analyser kan være væsker, som er testet ved konventionelle metoder, men som med fordel kan analyseres ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Udtrykket "ligand" refererer til et vilkårligt stof eller en stofgruppe, hvis nærværelse kvalitativt eller kvantitativt skal bestemmes i en væskeprøve, såsom den netop beskrevne. Den omhandlede prøvemethode kan benyttes til detektion af ligander, for hvilke der er en specifik bindingspartner samt også til detektion af kapaciteten af et

væskeformigt medium til binding af en ligand (sædvanligvis som følge af tilstedeværelsen af en bindingspartner for liganden i prøven). Liganden er sædvanligvis et peptid, et protein, et carbonhydrat, glycoprotein, steroid
5 eller et andet organisk molekyle, hvortil en bindingspartner eksisterer eller kan tilvejebringes ved immunologiske eller syntetiske metoder. Liganden er sædvanligvis udvalgt blandt antigener og antistoffer hertil; haptener og antistoffer hertil; og hormoner, vitaminer, metabolitter og farmakologiske midler og deres receptorer og bindingsstoffer og normale serumbestanddele og sygdomsmarkører.
10

Udtrykket bindingspartner refererer til et vilkårligt stof eller en stofgruppe, som har en specifik bindingsaffinitet for liganden i nærværelse af andre stoffer. Ved de fleste udførelsesformer omfatter den foreliggende opfindelse specifikke bindingsanalyseresagenser, som reagerer med liganden eller bindingsmidlerne i prøven på immunokemisk måde. Dvs. der er et antigen-antistof eller hapten-antistof-forhold mellem reagenser og/eller ligand eller bindingsmidlet i prøven. Sådanne prøver betegnes derfor som immunoanalyser, og den særlige indvirkning mellem liganden og receptoren herfor er immunokemisk binding.
20 Det vil imidlertid forstås, at andre bindingsindvirkninger mellem liganden og bindingspartneren tjener som basis for specifikke bindingsanalyser, herunder bindingsindvirkninger mellem hormoner, vitaminer, metabolitter og farmakologiske agenter og deres respektive receptorer og koblingsbestanddele. F.eks. er polypeptidhormon-receptorer som bindings- eller koblingsmidler diskuteret i Langan, et al., (Eds.), Ligand Assay, Masson Publishing U.S.A. Inc., New York, side 211 et seq. (1981).
25

Ved et liposom skal i den foreliggende beskrivelse forstås en af et enkelt eller flere kamre bestående beholder af lipider, især lipidblandinger, omfattende mindst ét
35

phospholipid, som danner en kontinuerlig væg eller en af lipider bestående dobbeltlags-membran. Yderligere fællesbestanddele af disse lipidblandinger er kolesterol og phospholipider med ladet lang kæde. Liposomer kan fremstilles på vilkårlig kendt måde. F.eks. kan fremstilles multilamellare liposomer ved inddampning af en film og hydratisering af lipidfilmen. Beholdere dannet ved omvendt faseinddampning kan også fremstilles. Disse er eksempler på metoder, som fører til velegnede beholdere. En almindelig oversigt over liposomer og deres fremstilling ses af Papahadjopoulos, et al., (Ed). Liposomes, Ann. N.Y. Acad. Sci., bind 308 (1978); Tom, et al., (Ed)., Liposomes and Immunobiology, Elsevier North Holland Inc. N.Y. (1980) og Gregoriadis, et al., Liposomes in Biological Systems, John Wiley & Sons, N.Y. (1980).

Liposomer kan fremstilles med overflade-inkorporeret ligand- eller ligandanalog. Sådanne liposomer dannes ved hjælp af ligand-amphiphile konjugater, der sædvanligvis har form af et ligand-kobler-amphiphilt molekyle. Amphiphiler er stoffer, som kan indeholde både vandopløselige og vanduopløselige regioner. De kan bedst eksemplificeres ved amphiphiler, såsom phosphatidyl-ethanolaminer, phosphatidyl-serin, phosphatidyl-inositol, spingomyelin-cerebrosider, phosphatidinsyre, plasmalogener, cardiolipiner og fedtsyrer.

I stedet kan liganderne være covalent bundet eller adsorberet til overfladen af forud formede liposomer. Når liposomer forud formes, kan de i deres ydre overflade have flere kemiske funktioner, hvortil antigener kan være covalent bundet. Hensigtsmæssige reaktioner, som kan udføres med sådanne koblinger, er beskrevet af Williams et al., i Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. 1, Academic Press, New York (1967). I nogle tilfælde kan antigener adsorberes til liposomoverfladen som vist af Uemura og Kinsky, Biochemistry, 11: 4085-4094 (1972).

Reagenset ifølge opfindelsen er sammensat som angivet i krav 5-10 og omfatter et stof, der nedbryder eller gennemtrænger liposomvæggen ved binding af overfladeinkorporeret ligand eller ligandanalog og bindingspartneren.

5 Hovedeksemplet for dette stof er en gruppe forbindelser, der kollektivt omtales som komplement. En almen oversigt over komplement og virkningen af disse er givet af Rapp., et al., Molecular Basis of Complement Action, Appleton-Century-Crofts (1970). Virkningen af komplement

10 er også omtalt i mange af de ovenfor citerede referencer vedrørende andre liposom-immunoanalyser.

Reagenset kan anvendes i mange forskellige detektionssystemer, som benyttes til det angivne formål, herunder de

15 i de ovenfor citerede referencer beskrevne. Som nævnt omfatter det omhandlede reagens yderligere mindst ét overfladeaktivt stof, der er ikke-ionisk, og som ikke modificerer liposomnedbrydningen eller indvirker på de immunologiske reaktioner, som danner basis for den specifikke

20 bindingsanalyse. Sådanne overfladeaktive stoffer kan forekomme i det omhandlede reagens i en koncentration af 0,1 og 1,0%.

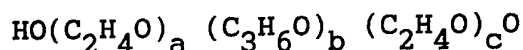
Ifølge en udførelsesform for opfindelsen anvendes som

25 overfladeaktivt stof en polyoxyethylenpolymer med mindst ca. 23 ethylenoxidmonomere enheder. Disse kan endvidere have hydrofobe grupper med C_8 - C_{17} , herunder aromatiske og alifatiske bestanddele. Eksempler på en sådan udførelsesform er følgende: polyoxyethylen-laurylethere med mindst

30 23 ethylenoxid-enheder (Brij-35, ICI United States, Inc. Wilmington, DE); nonyl-phenoxy-polyethoxyethanol med mindst 30 ethylenoxid-monomere enheder (Igepal CO-880), GAF N.Y. NY), og octyl-phenoxy-polyethoxy-ethanol med mindst 30 ethylenoxid monomere enheder (Triton X-305,

35 Rohm & Haas, Philadelphia, PA).

Ifølge endnu en udførelsesform anvendes et overfladeaktivt stof med formlen:



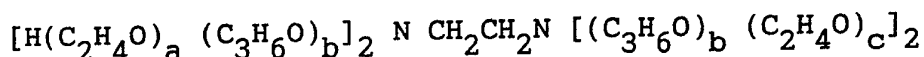
5

hvor b er mindst 15 og a plus c er fra 11 til 73. Foretrukne midler er sådanne, hvor a plus c kan være 11, 18, 34, 41, 46, 49, 51 eller 73. Sådanne overfladeaktive stoffer forhandles under varemærket Pluronic fra BASF-Wyandotte Corp., Parsippany. NJ.

10

En tredje udførelsesform omfatter også aktive stoffer med formlen

15



hvor b er mindst 5, fortrinsvis fra 5 til 15, og a plus c er fra 30 til 113. Blandt disse forbindelser foretrækkes sådanne, hvor a plus c betyder 30, 50, 68, 75, 95 og 113. Sådanne overfladeaktive stoffer er tilgængelige under varemærket Tetronic fra BASF-Wyandotte Corp., supra.

20

Som ovenfor angivet er opfindelsen især egnet i forbindelse med et kontinuerligt strømningssystem. Et særligt velegnet system af denne art er genstand for U.S.A. patentskrift nr. 4 853 336. Ved et sådant kontinuerligt strømningssystem føres en strøm af skiftevis sekvenser af gas- og væskeportioner gennem et enkelt rør, som omfatter en første, en anden og en tredje sektion. En første flydende portion af en analyse indeholdende liganden og et første reagens omfattende (a) en bindingspartner for liganden, (b) en anden komponent af et detektionssystem med en første og anden komponent, og (c) et overfladeaktivt stof af den ovenfor beskrevne art indføres i rørledningen. Dernæst indføres et første luftsegment, der virker afspærrende i den første rørsektion. Derpå bliver et andet væskesegment af et andet reagens omfattende (d) en

25

30

35

selektiv tilgængelig bærer med en i overfladen inkorpore-
ret ligand eller ligandanalog og, inde i blæren, en før-
ste komponent af et detektionssystem, som er reaktivt med
den anden komponent til dannelse af et detekterbart re-
spons, (e) et stof, som nedbryder liposom i dette respons
til binding af den overflade-inkorporerede ligand eller
ligandanaloge og bindingspartneren og (f) et overfladeak-
tivt stof af den ovenfor beskrevne art indført. En anden
luftportion, som er afspærrende i den første rørsektion
bliver derefter indført. Portionerne holdes adskilte, me-
dens de befinder sig i den første rørsektion, og de føres
derefter ind i en anden rørsektion med en så meget større
diameter end den første rørsektion, at det første gasseg-
ment ikke virker afspærrende i den anden sektion. De før-
ste og anden væskeportioner forenes, og første og anden
gasportioner flyder sammen i den anden rørsektion. De
forenede væskeportioner opretholdes adskilte fra andre
væskeportioner ved afspærring af den anden og tredje rør-
sektion med den sammensmeltede gasportion og blandes
fuldstændig i den tredje rørsektion. Den således forenede
væskeportion analyseres derefter for detekterbar respons,
medens den passerer gennem den tredje rørsektion.

Opfindelsen skal i det efterfølgende illustreres nærmere
ved hjælp af nogle eksempler.

EKSEMPEL I

Dilantin-liposom-kompatible overfladeaktive stoffer

I dette eksempel anvendtes et immunoanalyse-reagens be-
stående af en dilantin-liposom indeholdende β -galactosi-
dase, komplement, antistof til dilantin, O-nitrophenyl- α -
D-galactosid (chromogen) og forskellige overfladeaktive
stoffer til bestemmelse af effekten af hvert af de over-
fladeaktive stoffer på de kemiske reaktioner eller immu-
nolyse af liposomet. Ingen prøve af fri dilantin blev

indført ved denne undersøgelse af reagensmidlet, således at maksimal immunolyse kunne iagttages.

Liposom-fremstilling

5

Liposom indeholdende dilantin og α -galactosidase-enzym blev fremstillet på følgende måde. Der blev fremstillet en blanding indeholdende 22 milligram (mg) æg-lecithin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 8,70 mg cholesterol (Sigma, supra), 0,65 mg dl-atocopherol (Sigma, supra) og 2,76 mg dilantin-amphiphil-konjugat i 100 ml chloroform. Et sådant dilantin-konjugat kan fremstilles ved en procedure, som er beskrevet af Haga et al., i Biochem Biophys. Res. Comm. 90: 187-192 (1980). Denne blanding blev ind-

15 ført i en 500 ml kolbe med en roterende fordamper. Kolben blev roteret, og chloroformen blev afdampet under vakuum på et vandbad ved 40 °C, indtil der blev iagttaget en tør hinde på indersiden af kolben. Derefter blev denne hinde yderligere tørret i 1 time under vakuum ved 0,25 mmHg.

20 Hinden blev afvandet med 7 ml Tris-puffer som ovenfor beskrevet, indeholdende 7,8 mg β -galactosidase (Sigma, supra) i 18 timer ved 4 °C under omrøring. De således fremstillede liposomer blev skilt fra komponenter i blandingen, som ikke havde dannet liposomer, ved at anvende

25 en ultracentrifuge af typen L8-55 Beckman med en omdrejningshastighed på 32 000 omdr./minut ved 8 °C i 25 minutter.

Andre præparationer

30

Stamopløsningen af Tris-puffer (pH - 7,5) blev fremstillet ved en blanding af 60,5 g/liter tris-hydroxymethylaminomethan med 8,7 g/liter natriumchlorid og 1 g/liter natriumazid.

35

Antidilantin-antistof-opløsning blev fremstillet ud fra kommercielt tilgængeligt anti-dilantin kanin-antiserum

(Cappel Laboratories, Cockrahnville, PA). 900 μ l tris-puffer-opløsning blev sat til en ampul indeholdende 100 μ l Cappel-antiserum til opnåelse af en antistof-opløsning med koncentration 1:10 (v/v).

5

Komplement-opløsning blev fremstillet ved rekonstituering af 1 g lyofiliseret serum fra marsvin (Pel Freez, Rogers, AK).

- 10 De til sammenligning udvalgte overfladeaktive opløsninger fremstilledes hver for sig ved opløsning af 1 g overfladeaktivt stof i 100 ml tris-puffer til opnåelse af en 1% (w/v) opløsning. De forskellige overfladeaktive stoffer var tritoner (Rohm and Haas, Philadelphia, PA), Igepals
15 (GAF Corp., New York, NY), PEG-4000 (Union Carbide, New York, NY), Brij-35 (ICI America Inc., Wilmington, DE), Pluronic (BASF-Wyandotte Corp., supra) og Tetronics (BASF-Wyandotte Corp., supra). De er nævnt i efterfølgende tabel I, og det samme er tilfældet for antallet af
20 ethylenoxidmolekyler i hver af prøverne.

Reagenspræparation

- Reagens R_1 blev fremstillet ved at kombinere 100 μ l komplement-opløsning, 100 μ m anti-dilantinantistof-opløsning, 100 μ l nitrophenol- β -B-galactosid som substrat og
25 50 μ l tris-opløsning.

- Reagens III blev fremstillet ved at forene 5 μ l af liposom-præparationen, 255 μ l tris-puffer og 70 μ l af et udvalgt overfladeaktivt stof på hver R_1 -præparation. Slutkoncentrationen af det overfladeaktive stof var 0,1% (v/v) i hvert tilfælde.

35

Analysemetode

350 μ l af hvert af reagenserne R_1 og R_2 blev blandet sammen og pipetteret over i en gennemstrømningskuvette af typen 260 Gilford Spectrophotometer, som blev benyttet efter producentens forskrift (Gilford Instruments Co., Oberlin, OH). Reaktionshastigheden blev målt ved 405 nm ved at måle ændringen af den optiske densitet over et givet tidsrum. Det første eksperiment blev udført på blandinger, hvori de overfladeaktive stoffer var tilstede (S^+) og dilantin-antistof var udeladt (AB^-). Ved den anden serie eksperimenter var overfladeaktivt stof (S^+) og antistof (AB^+) begge tilstede. Forholdet mellem hastigheder af hydrolyse af beta-galactosidsubstrat, med og uden antistof (AB^+/AB^-), er vist i tabel I. Det fremgår heraf, at visse overfladeaktive stoffer lyserer liposomer, selv i fravær af antistof, og at de overfladeaktive stoffer, der blev undersøgt, ikke indvirkede på immunolyse. I de næste to forsøg blev det overfladeaktive stof i reagens R_2 erstattet med samme rumfang tris-puffer-opløsning. Antistof blev indført i den første og udeladt fra den anden ved disse forsøg. Dette blev gjort for at vise, at immunolyse forekom i fravær af overfladeaktivt stof, og dette blev benyttet som sammenligningsforsøg. Af det første af de ovennævnte forsøg og sammenligningsforsøget blev beregnet forholdet mellem hastigheder af beta-galactosid-hydrolyse, med og uden overfladeaktivt stof (S^+/S^-), og disse målinger findes ligeledes i tabel I.

30

35

TABEL I

	Overflade- aktivt stof	EtO	AB ⁺ /AB ⁻	S ⁺ /S ⁻
5				
	Tris-puffer	-	2,5	1,0
	Igepal CO-630	10-11	-	2,6
	Igepal CO-710	20	-	3,0
	Igepal CO-880	30	2,5	1,0
10	Triton X-100	9-10	-	4,0
	Triton X-102	12-13	-	4,0
	Triton X-165	16	-	4,0
	Brij-35	23	2,5	1,0
	Triton X-305	30	2,5	1,0
15	PEG (4000)	90	2,5	1,0
	Pluronic L-43	11	2,5	1,0
	Pluronic L-44	18	2,5	1,0
	Pluronic L-62	9	-	3,7
	Pluronic L-63	17	2,5	1,0
20	Pluronic L-64	26	2,5	1,0
	Pluronic P-75	46	2,5	1,0
	Pluronic P-84	34	2,5	1,0
	Pluronic P-85	51	2,5	1,0
	Pluronic P-94	41	2,5	1,0
25	Pluronic P-104	49	2,5	1,0
	Pluronic P-105	73	2,5	1,0
	Tetronic 504	30	2,5	1,0
	Tetronic 704	50	2,5	1,0
	Tetronic 904	75	2,5	1,0
30	Tetronic 1104	96	2,5	1,0
	Tetronic 1304	113	2,5	1,0
	Tetronic 1504	46	2,5	1,0

Konklusioner

35

De overfladeaktive stoffer af typen henholdsvis Igepal og Triton, nonyl- og octylphenoler, med ethylenoxid-monomere

enheder mindre end 23, viste sig at lysere liposomer, bestemt ved S^+/S^- -forholdet, og forhindrede således effektivt enhver bestemmelse baseret på immunolyse. Det overfladeaktive stof af typen Brij-35 med 23 monomere enheder ethylenoxid, Igepal, Triton og PEG 4000 med 30 eller flere monomere enheder ethylenoxid, forårsagede ikke lyse eller indvirkning på den immunologiske reaktion. Endvidere skete der ingen lyse af overfladeaktive stoffer af typen Tetronic med 30 eller flere monomere enheder ethylenoxid på liposomerne eller indvirkning på de immunologiske reaktioner.

Endnu mere overraskende er det, at de overfladeaktive stoffer af typen Pluron med så få som 11 monomere ethylenoxid-enheder ikke lyserer liposomerne eller indvirker på de immunologiske reaktioner.

EKSEMPEL II

Phenobarbital-liposom-kompatibelt overfladeaktivt stof

De i dette eksempel rapporterede forsøg blev udført til bestemmelse af virkningen af forskellige overfladeaktive stoffer på liposomer med phenobarbital i overfladen og anvendt i præparater til immunoanalyse i et automatiseret analyseapparat, hvori der med tilfældige mellemrum indførtes analyseprøver. Ingen prøve med fri phenobarbital blev inkluderet i disse forsøg, således at maksimal immunolyse kunne observeres.

Sammensætningen af reagenserne R_1 og R_2 var følgende:

Reagens R₁

	1. Substrat	235 µl
	2. Antistof (1:100)	25 µl
5	3. Komplement (1:2)	40 µl
	4. Overfladeaktivt stof (1%)	40 µl
	5. Tris-puffer	35 µl

Reagens R₂

10	1. Liposom (1:20)	15 µl
	2. Tris-puffer	30 µl
	3. Overfladeaktivt stof (1%)	5 µl

15 Liposomerne blev fremstillet som beskrevet i eksempel I med den ændring, at der blev benyttet phenobarbitalkonjugat. Alle de øvrige væskepræparater var som beskrevet i eksempel I med den ændring, at der blev benyttet anti-phenobarbital kaninserum fra Cappel Laboratories, som
20 ovenfor angivet.

Bestemmelsen blev udført med et analyseapparat af typen RA-1000, fremstillet af Technicon Instruments Corporation, Tarrytown, NY.

25 De samme sammenligninger blev udført som i eksempel I til bestemmelse af effekten af forskellige overfladeaktive stoffer. Resultaterne er som angivet i tabel II.

30

35

TABEL II

	Overflade- aktivt stof	AB^+/AB^-	S^+/S^-
5	Tris-puffer	6,8	1
	Igepal CO-630	-	6,8
	Igepal CO-710	-	6,8
	Igepal CO-880	6,5	1
10	Triton X-100	-	6,8
	Triton X-102	-	6,8
	Triton X-305	6,5	1
	Brij-35	6,5	1
	Pluronic L-43	6,8	1
15	Pluronic P-84	6,8	1
	Pluronic P-85	6,8	1
	Pluronic P-104	6,8	1
	Pluronic P-105	6,8	1
	Tetronic 504	6,4	1
20	Tetronic 704	6,4	1
	Tetronic 904	6,4	1
	Tetronic 1104	6,4	1
	Tetronic 1304	6,4	1
	Tetronic 1504	6,4	1

25

Konklusioner

Overfladeaktive stoffer af typen Triton og Igepal med 10-20 monomere enheder ethylenoxid viser sig at lysere liposomer ($S^+/S^- = 6,5 - 6,8$) og forhindrede således effektivt enhver bestemmelse baseret på immunolyse. Imidlertid viste det sig, at Brij-35, Triton X-305 og Igepal CO-880 ikke lyserede liposomerne. På tilsvarende måde viste det sig, at overfladeaktive stoffer af typen Tetronic med 30 eller flere monomere ethylenoxid-enheder og overfladeaktive stoffer af typen Pluronic med 11 til 74 monomere ethylenoxid-enheder ikke lyserer liposomer ($S^+/S^- = 1$).

EKSEMPEL IIIPhenobarbital-immunoanalyse under anvendelse af Pluronic 105

5

De i dette eksempel rapporterede eksperimenter viser anvendelsen af et immunoanalyserens ifølge opfindelsen til bestemmelse af phenobarbital i et automatiseret klinisk analyseapparat.

10

De her anvendte reagenser R_1 og R_2 var de samme som beskrevet i eksempel II, idet der som overfladeaktivt stof anvendtes Pluronic P-105, og forsøget blev udført på et system af typen RA-1000 efter den af leverandøren angivne brugsanvisning.

15

Dosis/respons-forholdet blev observeret under anvendelse af phenobarbital-liposomer med og uden overfladeaktivt stof. Kontrolprøver (Syva Company, Palo Alto, CA) med phenobarbital-koncentrationer på 0, 5, 10, 20, 40 og 80 $\mu\text{l/ml}$ blev anvendt som "ligand-indeholdende prøve" til opnåelse af data, der demonstrerer forhold mellem dosis/respons. Effekten ved tilstedeværelse og fravær af overfladeaktivt stof af typen Pluronic P-105 og lysis af liposom er anført i tabel III.

25

30

35

TABEL IIIEffekt af Pluronic 105 på phenobarbital-bestemmelse

5	Phenobarbital ($\mu\text{g/ml}$)	% Lysis	
		Uden	Med
	0	100	100
	5	85	84
10	10	69	66
	20	52	50
	40	19	19
	80	6	6

15 Som det også fremgår af disse data havde overfladeaktivt stof af typen Pluronic 105 ingen indvirkning på immunoanalyse-reaktionerne eller den opnåede nøjagtighed af den rapporterede ligand-koncentration på ethvert punkt af hele det dækkede område.

20 Dernæst blev foretaget en sammenlignende undersøgelse, hvorved phenobarbital blev bestemt i prøver af humant serum i nærværelse og fravær af overfladeaktivt stof af typen Pluronic 105 på det ovenfor beskrevne system RA-1000.

25 Korrelationskoefficienten viste sig at være 0,986 med en hældning på 0,97.

30 Det er således demonstreret, at den foreliggende opfindelse anviser et immunoanalyse-reagens og en fremgangsmåde, som er dosis-responsiv og giver resultater, der korrelerer udmærket med samme metode i fravær af overfladeaktivt stof.

35

EKSEMPEL IVPhenobarbital-immunoanalyse med Tetronic 704

- 5 De i dette eksempel rapporterede forsøg demonstrerer anvendelsen af et immunoanalyse-middel ifølge opfindelsen til bestemmelse af phenobarbital i et automatiseret klinisk analyseapparat.
- 10 Reagenserne R_1 og R_2 var nøjagtig som beskrevet i eksempel II, idet der som overfladeaktivt stof anvendtes Tetronic 704, og forsøgene blev udført på et system af typen RA-1000 i overensstemmelse med fabrikantens brugsanvisning.
- 15 Forholdet mellem dosis og respons blev iagttaget under anvendelse af phenobarbital-liposomer med og uden overfladeaktivt stof. Kontrolprøver (Syva Company, Palo Alto, CA) med phenobarbital-koncentrationer på 0, 5, 10, 20, 40
- 20 og 80 $\mu\text{g/ml}$ anvendtes som "ligand-holdig prøve" til at producere data, der viser forholdet mellem dosis og respons. Effekten af nærvær og fravær af overfladeaktivt stof af typen Tetronic 704 på lyse af liposom er angivet i tabel IV.

25

30

35

TABEL IVEffekt af Tetronic 704 på phenobarbital-bestemmelse

5	Phenobarbital ($\mu\text{g/ml}$)	% Lysis	
		Uden	Med
	0	100	100
	5	90	90
10	10	72	70
	20	55	52
	40	22	21
	80	8	7

15 Det fremgår af disse data, at det overfladeaktive stof af Tetronic 704 ikke havde nogen virkning på immunoanalyse-reaktionerne eller den opnåede nøjagtighed af ligand-koncentrationen noget sted i hele det dækkede område.

20 Sammenligningsundersøgelser, hvori phenobarbital blev bestemt i prøver af humant serum udførtes i nærvær og fravær af overfladeaktivt stof af typen Tetronic 704 på det ovenfor beskrevne system RA-1000. Korrelationskoefficienten viste sig at være 0,960 med en hældning på 0,96.

25 Disse forsøg demonstrerer således en god korrelation ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen med samme metode i fravær af overfladeaktivt stof.

30

35

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af en
5 analyt-ligand i en prøve under anvendelse af et automatiseret analyseapparat, hvorved prøven behandles med et reagens omfattende liposomer med i overfladen inkorporeret analyt-ligand eller ligand-analog og indeholdende et
10 detektionssystem, som omfatter mindst en første og en anden komponent, der reagerer indbyrdes til fremkaldelse af et detekterbart respons, og endvidere et stof, som dekomponerer liposomer som følge af binding af den i overfladen inkorporerede analyt-ligand eller ligand-analog og
15 bindingspartneren, k e n d e t e g n e t ved, at reagenset yderligere indeholder mindst et ikke-ionisk overfladeaktivt stof, som ikke dekomponerer liposomer, hvorefter muligt detekterbart respons fremkaldt af detektionssystemet observeres.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
20 ved, at
- a) at prøven omsættes med den første komponent, som består af bindingspartneren for liganden med den anden
25 komponent af detektionssystemet og med mindst et overfladeaktivt stof, som ikke nedbryder liposomet,
- b) at reaktionsblandingen fra trin (a) omsættes med den
30 anden komponent, der består af det nævnte liposom, som har en med liganden eller ligand-analogen inkorporeret overflade, i hvilket liposom der findes en første komponent af detektionssystemet, som er reaktiv med den anden komponent til opnåelse af et detekterbart respons, nævnte reagens til at nedbryde liposomet ved
35 respons til binding af overflade-inkorporeret ligand eller ligand-analog og bindingspartneren, og mindst et overfladeaktivt stof, der ikke nedbryder liposomet, og

c) at et eventuelt derved opnået detekterbart respons observeres.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t
5 ved, at (a) prøven omsættes med en første komponent omfattende antistof til liganden, at komponenter af detektionssystemet omfatter et enzymsubstrat og et stof, der ændres detekterbart ved indvirkning af substratet med et enzym derfor og mindst et overfladeaktivt stof, der ikke
10 nedbryder liposomet, og at trin (b) omfatter en reaktion af reaktionsblandingen fra trin (a) med en anden komponent, bestående af et liposom med en overflade, der er inkorporeret med liganden eller ligand-analogen og, indeholdt i liposomet, et enzym, som er reaktivt med substratet til således at ændre til detekterbare stof, et komplement og mindst et overfladeaktivt stof, som ikke nedbryder liposomet.
15

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, k e n d e t e g n e t
20 ved, at prøven eller prøverne er en flydende portion af en gas eller væske, der strømmer gennem et rør med en enkelt indføringsåbning, hvilket rør omfatter, i rækkefølge, en første, anden og tredje sektion, idet der i trin (a) gennem åbningen indføres en første væskeportion af prøven og den første komponent, hvorefter der gennem
25 åbningen indføres en første gasportion, som fylder den første rørsektion, hvorefter der gennem åbningen indføres en anden væskeportion indeholdende den anden komponent, hvorpå der gennem åbningen indføres en anden gasportion, som fylder den første rørsektion, idet gasportionerne holdes adskilte, idet portionerne i trin (b) føres ind i den anden (næste) rørsektion, der har en så meget større diameter end den første rørsektion, at den første gasportion ikke udfylder hele den anden rørsektion,
30 on, således at den første og den anden væskeportion forenes i den anden rørsektion, og så den første og den anden gasportion flyder sammen i den anden rørsektion, idet
35

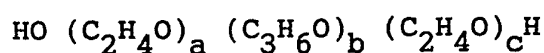
de kombinerede væskeportioner holdes adskilt fra andre (efterfølgende) væskeportioner ved, at den anden og den tredje rørsektion fyldes med den sammenflydte gasportion, idet de kombinerede væskeportioner blandes fuldstændigt i den tredje rørsektion, hvorpå denne blanding analyseres for detekterbart respons, medens den passerer gennem den tredje rørsektion.

5. Reagens til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge ethvert af kravene 1-4, omfattende liposomer med i overfladen inkorporeret analyt-ligand eller ligand-analog og indeholdende et detektionssystem, som omfatter mindst en første og en anden komponent, der reagerer indbyrdes til fremkaldelse af et detekterbart respons, og endvidere et stof, som dekomponerer liposomer som følge af binding af den i overfladen inkorporerede analyt-ligand eller ligand-analog og bindingspartneren, k e n d e t e g n e t ved, at reagenset yderligere indeholder mindst et ikke-ionisk overfladeaktivt stof, som ikke dekomponerer liposomer.

6. Reagens ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at liposomets lipidmembran er et phospholipid, hvori der eventuelt er inkorporeret en sterol, eller som omfatter en amphiphil, hvortil liganden eller ligandanalogen er bundet.

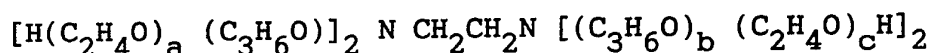
7. Reagens ifølge krav 5 eller 6, k e n d e t e g n e t ved, at det overfladeaktive stof er (A) en polyoxyethylen-polymer af mindst 23 monomere ethylenoxid-enheder og fortrinsvis har en hydrofob C_8 - C_{17} -gruppe, såsom lauryl-ether, (B) eller en nonylphenoxyethoxyethanol med mindst 30 monomere ethylenoxidenheder, eller (C) en octylphenoxyethoxyethanol med mindst 30 monomere ethylenoxidenheder.

8. Reagens ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det overfladeaktive stof har formelen:



5

hvor b er mindst 15 og a + c er mellem 11 og 73, fortrinsvis 11, 18, 34, 41, 46, 49, 51 eller 7, eller



10

hvor b er mindst 5 og a + c ligger mellem 30 og 113, fortrinsvis fra 50 til 75.

9. Reagens ifølge ethvert af kravene 5-8, k e n d e -
 15 t e g n e t ved, at bindingspartneren for liganden er et antistof til liganden, at den første komponent i detektionssystemet er β -galactosidase, indeholdt i liposomet, at detektionssystemet også omfatter et substrat for β -galactosidasen og, som den nævnte anden komponent, omfatter
 20 et stof, som detekterbart ændres ved indvirkning af β -galactosidase og substratet herfor, og at stoffet, som nedbryder liposomet, er komplement.

25

30

35