



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231217

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

G 01 N 33/54

(22) Přihlášeno 23 12 80
(21) (PV 4135-82)

(40) Zveřejněno 13 01 84

(45) Vydáno 15 06 86

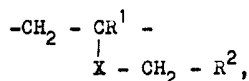
(75)

Autor vynálezu

ŠVEC FRANTIŠEK ing. CSc., HŘEBEČ, BOUCHAL KAREL ing. CSc.,
ŽŮRKOVÁ EVA ing. CSc., KÁLAL JAROSLAV prof. ing. DrSc., PRAHA (ČSSR),
BATZ HANS-GEORG RNDr., TUTZING, TANSWELL PAUL PhDr., PLANEKG,
BAIER MANFRED RNDr., PÖCKING-POSSENHOFEN (NSR)

(54) Diagnostický prostředek

Diagnostický prostředek obsahuje hydro-
filní latexové částice o průměru 0,15 až
1,5 μ m sestávající ze zpolymerizovaných
jednotek obecného vzorce



kde

R^1 je vodík nebo metyl a

X je -O- nebo -CO-O- a

R^2 je skupina -CH=O, -CH(OH)-CH₂-NH₂,
-CH - CH₂ nebo -CH(OH)-CH₂-SH nebo

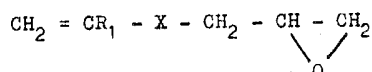
směsí zpolymerizovaných jednotek
obecného vzorce I s 1 až 99 % hmot.
zpolymerizovaných monomerů vybraných
ze skupiny zahrnující styren, di-
vinylbenzen, alkyl- či hydroxyalkyl-
akryláty nebo metakryláty, akryl- či
metakrylamidy, N-vinylpyrrolidon,
vinylacetát, butadien a isopren, na
nichž je přímo nebo přes prostorovou
spojku navázána biologicky a/nebo
imunologicky aktivní látka vybraná
ze skupiny zahrnující peptidy, pro-
teiny, enzymy, hormony, vitaminy,
antigeny, protilátky a mikroorga-
nismy.

Vynález se týká diagnostického prostředku, jehož charakteristickým znakem je, že jednou ze součástí jsou latexové částice.

Hydrofilní latexové částice nacházejí široké uplatnění v nejrůznějších oblastech biochemie, zejména jako nosiče biochemicky či imunologicky aktivních látek. Dosavadní způsoby syntézy latexových částic schopných vázat na svém povrchu biochemicky či imunologicky aktivní látky spočívá zejména ve standardní emulzní polymerizaci. Princip běžné emulzní polymerizace je obecně znám a spočívá v dispergování ve vodě omezeně rozpustného monomeru nebo směsi ve vodě rozpustných monomerů ve vodném roztoku emulgátoru a iniciátoru, zahřátí směsi na teplotu, při níž jsou generovány radikály zahajující řetězovou polymerizaci a udržování této směsi při požadované teplotě za míchání po dobu potřebnou k dosažení určité konverze.

Samotná polymerizace probíhá zpočátku v koloidních útvech zvaných micely (v nichž je monomer rozpustný) tvořených vhodně stericky uspořádanými molekulami povrchově aktivní látky. Po skončení polymerizaci zůstává povrchově aktivní látka i nadále na povrchu vzniklých polymerních latexových částic a stabilizuje je tak proti koagulaci. Odstavení emulgátoru je sice z větší části možné, leč dochází buď k nevratné ztrátě individuálního charakteru diskretních polymerních částic jejich agregací při koagulaci nebo alespoň k nemožnosti uvedení částic resuspendováním do původního stavu. Tato nevýhoda klasických latexů je odstranitelná použitím techniky tzv. bezemulgátorové emulzní polymerizace, kdy částice jsou autostabilizovány ionogenními skupinami, jež jsou součástí polymerního řetězce vzniklou při iniciační reakci.

Nejnovějším příkladem této polymerizace je způsob podle čs. autorského osvědčení č. 225 010 popisující syntézu latexových hydrofilních částic homo- či kopolymerizací monomerů obecného vzorce



kde

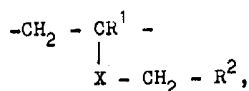
R_1 je vodík nebo metyl a

X je $-\text{O}-$ nebo $-\text{CO}-\text{O}-$ v nepřítomnosti emulgátoru vedoucí ke sférickým polymerním částicím stejné velikosti.

Tyto částice nesou jisté množství reaktivních skupin epoxidových, které lze použít k navázání biologicky či imunologicky aktivních látek na povrch částic. Epoxidová skupina nesporně splňuje řadu požadavků kladených na syntézu konjugátů polymer-aktivní látky, leč její nevýhodou je, že samotná reakce probíhá relativně pomalu. Dlouhá inkubace pak může v některých případech vést ke ztrátě biologické či imunologické aktivity. Tomu lze zabránit použitím nosičů, jejichž funkční skupiny jsou v porovnání s epoxidovou reaktivnější, tzn. že za podmínek, při nichž se imobilizace může z důvodů stability imobilizovaných látek realizovat, reagují rychleji.

To umožňuje získávat materiály vhodné pro použití v diagnostickém prostředku s dostatečnou aktivitou a bez dlouhých časových ztrát.

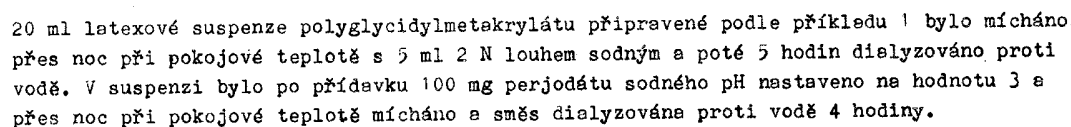
Předmětem vynálezu je diagnostický prostředek, vyznačený tím, že obsahuje hydrofilní latexové částice o průměru 0,15 až 1,5 μm sestávající ze zpolymerizovaných jednotek obecného vzorce



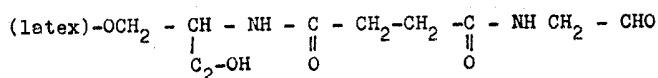
s 1 až 99 % hmot. zpolymerizovaných monomerů vybraných ze skupiny zahrnující styren, divinylbenzen, alkyl- či hydroxyalkylakryláty nebo metakryláty, akryl- či metakrylamidy, N-vinylpyrrolidon, vinylacetát, butadien a isopren, na nichž je přímo nebo přes prostorovou spojku navázána biologicky a/nebo imunologicky aktivní látka vybraná ze skupiny zahrnující peptidy, proteiny, enzymy, hormony, vitamíny, antigeny, protilátky a mikroorganismy.

P ř í k l a d 1

P ř í k l a d 2

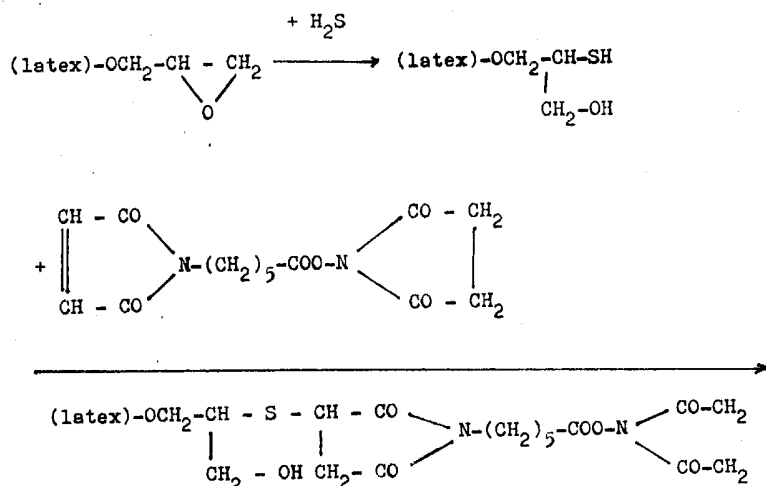


P ř í k l a d 3



20 ml latexové suspenze vyrobené podle příkladu 1 bylo mícháno s 10 ml amoniakového koncentrovaného roztoku po dobu 20 hodin při teplotě místnosti a dialyzováno 48 hodin proti tekoucí vodě. Vzniklá suspenze byla odstředěna. Obsah dusíku v suché hmotě je pak asi 1 % hmot. což odpovídá aminaci zhruba každé desáté epoxidové jednotky, avšak při upřednostnění reakce povrchových skupin lze na povrchu předpokládat vyšší stupeň derivatizace. Odstředěná pevná substance se rozmíchá opět ve 20 ml 0,1 N louhu sodném. K tomu se poté přikape 1,5 g N-hydroxysukcinimidesteru amidoacetaldehydacetaljantarové kyseliny (rozpuštěný v 6 ml dimetylformamidu). Vzniklá suspenze se míchá ještě 3 hodiny, pak se okyslí 1 N HCl na pH 3 a konečně dialyzuje proti tekoucí vodě 12 hodin.

P r i k l a d 4



20 ml latexu připraveného podle příkladu 1 bylo smíseno s 0,5 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ a mícháno při teplotě místnosti dva dny. Suspenze byla pak dialyzována proti tekoucí destilované vodě, až byla bez záplachu a poté odstředěna. Suchá látka obsahuje pek asi 2 % hmot. síry, což odpovídá derivatizaci zhruba každé desáté epoxidové jednotky, avšak ve skutečnosti vzhledem k přednostní reakci je derivatizace na povrchu částic vyšší. Odstředěný produkt se smísí s 1 g N-hydroxysukcinimidesteru kyseliny 6-maleinimidohexanové (rozpuštěný v 6 ml dimethylformamidu), ponechá 3 hodiny reagovat a pek se dialyzuje 12 hodin proti tekoucí destilované vodě.

P ř í k l a d 5

Tvorba konjugátu latex-gamma globulin

1 ml gamma globulinového roztoku (obsahující 56,6 mg proteinu) se smísí vždy s 20 ml latexové suspenze

- a) podle příkladu 1 vyrobené
- b) podle příkladu 2
- c) podle příkladu 3 a
- d) podle příkladu 4 derivatizované

ponechá reagovat a 12 hodin dialyzuje. Zbylé suspenze se odstředí. V supernatantu byl stanoven volný protein. Z výsledku lze určit podíl navázaný na latexové částice. Získá se navázáno

násada a 8 mg gamma globulinu
 násada b 43 mg gamma globulinu
 násada c 15 mg gamma globulinu
 násada d 19 mg gamma globulinu.

P ř í k l a d 6

Tvorba konjugátů latex - IgG

Jako v příkladu 5 byly z různých latexových suspenzí a roztoku IgG vyrobeny konjugáty latex-IgG. Tvorbou komplexu s protilátkou bylo potvrzeno obsazení latexových částí molekulami IgG.

V dalším budou popsány dva diagnostické prostředky jako příklady použití hydrofilních latexových částic podle vynálezu, a to k imunologickému stanovení tyroxinu (T_4) za pomoci T_4 protilátek z anti- T_4 -séra ovčí a ke stanovení humanního tyr(e)otropinu (TSH) v séru s pomocí dělicí techniky dvojité protilátky.

P ř í k l a d 7

Použití homopolyglycidylmetakrylátových latexových částic jako nosiče anti- T_4 -séra ovčí; diagnostický prostředek k provedení T_4 - ELISA. K provedení stanovení tyroxinu (T_4) pomocí ELISA se nejprve kovalentně naváží T_4 protilátky z ovčího anti- T_4 -séra na hydrofilní polyglycidylmetakrylátové latexové částice podle vynálezu, jež jsou derivatizovány podle jednoho z příkladů 2 až 4 a podle analogie s příklady 5 a 6 zreagovány s T_4 protilátkami. Takto získané protilátky na pevném nosiči (solid-phase antibody) představují první reagensii testu. Jako druhá reagensie slouží T_4 známým způsobem značený vhodným enzymem např. peroxidázou (POD) nebo beta-galaktózidázou (beta-gal), tedy spojený do enzymového konjugátu. Jako enzym byl v daném případě beta-gal. Jako třetí reagensie se zavádí vzorek s neznámým obsahem T_4 a jako čtvrtá reagensie pak obvyklý substrát pro beta-gal enzymový konjugát, a to v tomto případě nitrofenyl-beta-galaktosid v tris-HCl-pufu pH 7,3.

Princip testu spočívá na průběhu následujících tří reakcí:

1. Imunologické reakce mezi T_4 protilátkou kovalentně navázanou na hydrofilní latexové částice na jedné straně a enzymem značeným T_4 (enzymový konjugát) a volným T_4 obsaženým ve vzorku na straně druhé. Při této reakci dochází tedy k kompetitivní vazbě mezi protilátkou na pevném nosiči, enzymovým konjugátem a T_4 vzorku.

2. Dělení B/F (B = bound = navázaný, F = free = volný). Jedná se zde o dělení volného a vázaného enzymového konjugátu. Tohoto dělení lze s výhodou dosáhnout odštědění, nebo dialýzou proti vodě nebo vhodnému pufru.

3. Důkazová reakce enzymu, která probíhá mezi enzymovým konjugátem a pro daný použitý enzym specifickým, obvykle používaným substrátem a která může být sledována kolometricky nebo jiným způsobem. Enzymatická aktivita může být přitom sledována buď v supernatantu (volný podíl) nebo v resuspendovaném sedimentu (vázaný podíl).

Provedení pokusu:

Latex-anti- T_4 suspenze připravená shora uvedeným způsobem se zředí v poměru 1:1 000 vodou nebo pufrům. 0,5 ml této suspenze se smísí se 100 μ l standardního roztoku T_4 séra s různým, ale vždy známým obsahem T_4 a 100 μ l T_4 -beta-gal konjugátu v roztoku. Reakční směs se inkubuje 30 minut při teplotě místnosti. Během inkubace se směsí nepřetržitě míchá, zatímco druhá ná sada se stejným standardním obsahem T_4 se ponechá stát. Poté se suspenze vždy odstředí v kapelina, v níž se nachází F-fáze, se oddělí. B-fáze, tedy T_4 -beta-gal konjugát vázaný na pevné fázi, se nachází v sedimentu. Ke stanovení aktivity enzymu se pevná fáze smísí s přebytkem roztoku substrátu, sestávajícího z

450 mg/l p-nitrofenyl-beta-galaktosid (Fa.Sigma)
 100 mmol chloridu sodného
 10 mmol chloridu hořečnatého
 10 mmol tris/HCl pufru
 0,4 % (obj./obj.) merkaptetanolu
 pH 7,3

a známým způsobem se změní extinkce při vlnové délce 405 nm. Ukazuje se, že bez vnějšího míchání latexových částic, jsoucích ve vlnu, je signál o zhruba 11 % nižší.

Jakmile byly touto cestou zjištěny kalibrační křivky pro T_4 , byla pak stejným způsobem prováděna měření, v nichž namísto 100 μ l T_4 standardního séra bylo přidáno vždy 100 μ l vzorku s neznámým obsahem T_4 a měřena extinkce B fáze po resuspendování v roztoku substrátu.

Bylo zjištěno, že hydrofilní latexové částice jsou výborně vhodné jako nosiče pro protilátky a také antigeny a neovlivňují jejich imunologickou reaktivitu. Mohou být proto nasazeny s velkou výhodou jako nosiče při enzymimunotestech na pevné fázi. Dále bylo dokázáno, že latexové částice zůstávají po dlouhou dobu v prostředí pufru ve vlnu, protože hustota částic je zhruba rovna jedné. Dále jsou hydrofilní latexové částice podle výsledku též dobře odstřeďovatelné a resuspendovatelné, aniž by přitom utrpěla imunologická reaktivita.

P ř í k l a d 8

Enzymimunotest (EIA) ke stanovení lidského tyreotropinu (TSH)

Stanovení TSH v lidském séru má značný význam pro diagnózu onemocnění štítné žlázy. Primární hypotyreóza se pozná podle silně zvýšené bazální TSH koncentrace (10 až 100 μ U TSH/ml). Kromě toho může být s jistotou vyloučena hypertyreóza, když bazální hodnota TSH v séru nestoupá od 0,5 do 3 μ U/ml po stimulaci TRH (Tyroidea-releasing-hormon). Stoupne-li naproti tomu TSH o nejméně 2,5 μ U/ml, ale ne více než 25 μ U/ml, pak je s velkou pravděpodobností látková výměna štítné žlázy neporušena. Vzestup o výše jak 25 μ U/ml z více či méně zvýšené bazální hodnoty vede k závěru o latentní preklinické hypotyreóze. Enzymimunotesty na TSH jsou již známy (Clinica Chemica Acta 67, 263 až 268 (1976); Enzymy labelled immunoassay of hormones and drugs, Editor S. B. Pal, Walter de Gruyter, Berlin a New York, 1978, str. 327 až 337; Analytical Biochemistry 96, 419 až 425 (1979)). Tyto známé metody stanovení vyžadují nepřiměřeně dlouhé inkubační doby (až 5 dní), jsou necitlivé (5 μ U/ml) nebo předpokládají použití náročných měřicích přístrojů (fluorometr, luminometr), přičemž je potřebné též zařízení pro mísení násad.

Použití hydrofilních latexů podle vynálezu umožňuje nyní fotometrické stanovení TSH s celkovou inkubační dobou 2,5 dne dělicí technikou dvojité protilátky. Přitom je druhá protilátka kovalentně navázaná na hydrofilní latexové částice podle vynálezu. Navázaná enzymová aktivita se měří po B/F separaci. Protože latexové částice mají hustotu nepříliš odlišnou od hustoty vody, zůstávají během enzymové reakce ve vznosu, čímž odpadá obvyklé míchání. Při použití velmi zředěných latexových suspenzí, které je možné díky vysoké saturaci povrchu protilátkou, odpadá odstřeďování částic po odeznění enzymatické reakce, neboť je možné fotometrické stanovení i suspenzí.

Na rozdíl od obvyklých v imunologických testech používaných latexů lze hydrofilní polyglycidylmetakrylové latexy podle vynálezu pokryté protilátkou po odstředění lehce resuspendovat. Z téhož důvodu se ukazuje také velmi nepatrná nespecifická absorpce antigenu značeného enzymem (navázaná aktivita v nepřítomnosti primárních protilátek).

Provedení pokusu:

0,2 ml TSH standardu (mezinárodní referenční preparát MRC 68/38 v séru neobsahujícím TSH) se inkubuje s 0,1 ml známého anti-TSH-antiséra např. z morčat zředěného vodou nebo vhodným pufrům v poměru 1:150 000. Po 12 hodinách se ke směsi z prvního stupně pipetuje 0,1 ml roztoku enzymového konjugátu sestávajícího z kovalentně navázaného TSH na glukoso-oxidázu (GOD) (obsahujícího asi $1,5 \times 10^{-9}$ g TSH). K této směsi se po dalších 12 hodinách pipetuje 0,1 ml latexové suspenze. Suspenze obsahuje 0,1 až 1 mg/ml metakrylátového latexu, k němuž bylo - jako v příkladu 6 - přidáno na 1 000 mg suchých latexových částic 5 až 150 mg proteinu imunoglobulinové frakce získané z koziho séra proti IgG z morčat a tak provedena imobilizace kovalentní vazbou. Po jedné hodině se odstředí a sediment latexových částic se promyje 1 ml vhodného pufru, přičemž se částice resuspendují. Následně se odstřeďuje a promývá. Kapaliny se vylijí.

Ke každé násedě se přidá 1 ml roztoku substrátu pro GOD a krátce se protřepe. Latexové částice zůstanou poté nejméně 2 hodiny rovnoměrně suspendovány. Poté se suspenze převede do měřicí kyvety a měří se extinkce při 405 nm. Od každé extinkce se odečte hodnota slepého pokusu L_1 . L_1 je extinkce 1 ml roztoku substrátu, který obsahuje stejné množství pokrytých latexových částic jako výše zmíněná latexová suspenze, jež se přidává ke směsi anti-TSH antiséra a TSH-GOD.

Takto zjištěné extinkce se vynesou pro různé standardní koncentrace TSH. S pomocí těchto kalibračních křivek se pak na základě zjištěných extinkcí určuje koncentrace TSH v klinických vzorcích s neznámým obsahem.

Jako vhodný pufr se přednostně používá 0,04 M fosfátový roztok pH 7,4 obsahující 0,005 M EDTA, 0,1 % hovězí sequmelbumin a 0,15 M NaCl.

Jako GOD substrát je upřednostňován vodní roztok obsahující 5 g/100 ml glukózy, 100 mg/100 ml 2,2'-azino-di-(3-etyl-benzthiazolonsulfonovou (6) kyselinu) (ABTS), 5 mg/100 ml peroxidázy (POD), 0,05 M fosfátový pufr pH 5,6.

Pro srovnání byl určen obsah TSH ve třech vzorcích séra jak výše uvedenou EIA (A), tak i známou RIA s dvěma protilátkami (B). Jak ukazuje tabulka, zjištěné hodnoty vzájemně dobře souhlasí:

sérum 1	(A)	11,2 μ U/ml	(B)	12,5 μ U/ml
sérum 2		7,3		7,1
sérum 3		3,8		4,5

Také z výše uvedených stanovení TSH vyplývá, že hydrofilní latexové částice podle vynálezu jsou velmi vhodné jako nosiče biologických a/nebo imunologických substancí, zejména protilátek.

Stanovení nespecifické vazby

Standardní vzorek TSH se zpracuje způsobem popsaným v "provedení pokusu" (vzorek C) a porovná se s dalším obdobným vzorkem (D), který je podroben zhruba identickým přeměnám jako vzorek C. Při tom se však vynechá anti-TSH-antisérum.

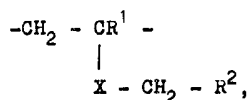
Porovnání změřených extinkcí pro oba vzorky C a D

	Vzorek C	Vzorek D
Extinkce měřená v suspenzi po odečtení L_1	1,028	0,015

ukazuje, že nespecifická vazba obnáší méně než 1,5 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Diagnostický prostředek, který obsahuje hydrofilní latexové částice o průměru 0,15 až 1,5 μm sestávající ze zpolymerizovaných jednotek obecného vzorce



kde R^1 je vodík nebo metyl a X je -O- nebo -CO-O- a R^2 je skupina -CH=O, -CH(OH)-CH₂-NH₂, -CH - CH₂ nebo -CH(OH)-CH₂-SH nebo směsí zpolymerizovaných jednotek obecného vzorce I

s 1 až 99 % hmot. zpolymerizovaných monomerů vybraných ze skupiny zahrnující styren, divinylbenzen, alkyl- či hydroxyalkylakryláty nebo metylakryláty, akryl- či metakrylamidy, N-vinylpyrrolidon, vinylacetát, butadien a isopren, na nichž je přímo nebo přes prostou spojku navázána biologicky a/nebo imunologicky aktivní látka vybraná ze skupiny zahrnující peptidy, proteiny, enzymy, hormony, vitamíny, antigeny, protilátky a mikroorganismy.