



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
 BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: G 01 N 33/44

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
 Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

637 218

<p>⑳① Gesuchsnummer: 4541/78</p> <p>⑳② Anmeldungsdatum: 26.04.1978</p> <p>⑳③ Priorität(en): 11.05.1977 DE 2721267</p> <p>⑳④ Patent erteilt: 15.07.1983</p> <p>⑳⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.07.1983</p>	<p>⑳⑦ Inhaber: Chandon Investment Planning Ltd., Grand Cayman/Cayman Island/W.I. (GB)</p> <p>⑳⑦② Erfinder: Dr. Hans A. Thoma, München (DE)</p> <p>⑳⑦④ Vertreter: E. Blum & Co., Zürich</p>
---	---

⑳⑤④ **Polymermatrix auf der Basis von Acrylamid.**

⑳⑤⑦ Es wird eine Polymermatrix auf der Basis von Acrylamid zur Immobilisierung von Antikörpern bei der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen und Pharmaka beschrieben. Die Polymermatrix besteht aus einem Copolymerisat des Acrylamids. Die Polymermatrix von Copolymerisaten des Acrylamids führt zu einer Bindungsspezifität des einzuschliessenden Antikörpers und verhindert unerwünschte Kreuzreaktionen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Polymermatrix auf der Basis von Acrylamid zur Immobilisierung von Antikörpern bei der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen und Pharmaka, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymermatrix aus einem Copolymerisat des Acrylamids besteht.

2. Polymermatrix nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einem Copolymerisat des Acrylamids und einer oder mehreren der Verbindungen Acrylsäure, Methacrylsäure, Methacrylamid, N-Hydroxymethylmethacrylamid und N,N'-Diallyltartardiamid und Salzen sowie Estern der Acrylsäure oder Methacrylsäure besteht.

3. Polymermatrix nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einem Copolymerisat aus Acrylamid und 20 bis 60 Mol-% Methacrylsäure besteht.

4. Polymermatrix nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einem Copolymerisat aus Acrylsäure und einem Alkali- oder Erdalkalisalz der Acrylsäure oder Methacrylsäure besteht.

Die Erfahrung bezieht sich auf eine Polymermatrix auf der Basis von Acrylamid zur Immobilisierung von Antikörpern bei der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen und Pharmaka.

Bei der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen und Pharmaka erfolgt eine Reaktion der Hormone oder Pharmaka mit einem Antikörper. Die Spezifität der Reaktion ist abhängig von der immunologischen Komplementarität, d.h. es kann eine Kreuzreaktivität mit Substanzen bestehen, die eine ähnliche chemische Konfiguration aufweisen. Bei einem Östriol-C₆-Konjugat liegt das Östriol in einer immundeterminanten Konfiguration vor, in der fast alle wichtigen funktionellen Gruppen des Östriols dem Bindungsbereich des Antikörpers exponiert sind. Trotzdem werden Östriol-Konjugate, deren Sulfat- oder Glucuronidrest die Position am phenolischen C₃ einnehmen, vom Antikörper in beträchtlichem Masse gebunden. Dies ist für die Bestimmung der freien Steroide besonders dann nachteilig, wenn die Konjugat-Konzentration der Proben die Steroidkonzentration um Zehnerpotenzen übersteigt, wie es bei den Östrogenen im Schwangeren-Serum der Fall ist.

Aus vorstehenden Gründen wurden bisher im wesentlichen Verfahren angewandt, bei denen die Spezifität durch Lösungsmittelextraktion vor dem Radioimmunoassay sichergestellt wurde. Lösungsmittelextraktionen stehen aber einer seriellen und maschinellen Probenbearbeitung im Wege.

Um die radioimmunologischen Methoden über Festphasen-Techniken zu vereinfachen, ist es bekannt, die Antikörper in einem Gel einzuschliessen. Nach den britischen Patentschriften 1452009 und 1452010 wird dabei als Gel Polyacrylamid verwendet, dem N,N'-Methylen-bis-acrylamid zugesetzt worden ist, und zwar als Vernetzungsmittel, d.h. um dem Gel die notwendige Porengrösse, Dichte und Festigkeit zu verleihen.

Die Vorteile der in einem solchen Gel eingeschlossenen Antikörper liegen im Ausschluss von störenden Molekülen höheren Molekulargewichts, der Einsparung von Pipettier- und Zentrifugierschritten und der langen Haltbarkeit des Antikörpers bei Raumtemperatur.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Bindungsspezifität des Antikörpers, wenn er in einem Polyacrylamid-Gel eingeschlossen ist, nicht den gewünschten Anforderungen entspricht.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, eine Polymermatrix bereitzustellen, mit der die Bindungsspezifität des einzuschliessenden Antikörpers erhöht und unerwünschte Kreuzreaktionen verhindert werden können.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass eine Variation und Erhöhung der Bindungsspezifität des Antikörpers durch Polymermatrices erzielt werden kann, die Copolymerisate des Acrylamids darstellen.

5 Gegenstand der Erfindung ist eine Polymermatrix auf der Basis von Acrylamid zur Immobilisierung von Antikörpern bei der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen und Pharmaka, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie aus einem Copolymerisat des Acrylamid besteht.

10 Besonders werden Copolymerisate aus Acrylamid und einer oder mehreren der Verbindungen Acrylsäure, Methacrylsäure, Methacrylamid, deren Derivaten und Salzen der Acrylsäure oder Methacrylsäure bevorzugt.

Durch die Copolymerisation des Acrylamids mit damit 15 copolymerisierbaren Verbindungen kann die Mikroumgebung der Polymermatrix beeinflusst werden. Die Wirkung beruht im wesentlichen auf hydrophoben und hydrophilen sowie elektrostatischen Effekten.

Durch die Variation der Polymermatrix mittels Copolymerisation ist eine wesentliche Erhöhung der Bindungsspezifität 20 des Antikörpers und eine Unterdrückung unerwünschter Kreuzreaktivitäten möglich. Die Polymermatrix wird durch geeignete Copolymerisation variiert, um einerseits eine spezifische Reaktion der Haptene mit dem immobilisierten Antikörper zu gewährleisten und andererseits kreuzreagierende Hap- 25 tene abzuhalten.

Aufgrund der erhöhten Spezifität gestatten es die Polymermatrices gemäss der Erfindung, direkt im nicht-extrahierten Serum zu messen.

Mit Hilfe der erfindungsgemässen Polymermatrices ist 30 eine sehr genaue radioimmunologische Bestimmung von Hormonen und Pharmaka möglich, da die Schwankung der Bestimmungswerte aufgrund von unspezifischen Bindungen zwischen den Steroidmolekülen und der Matrix durch die 35 Copolymerisation minimiert wird.

Bei verschiedenen Bestimmungen wie z.B. die der Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin werden kompetitive Substanzen benützt, wie Anilinnaphtholsulfonsäure, Merthiolat oder Salizylate, um die Hormone aus der Bindung mit den verschiedenen Bindungsproteinen im Serum zu verdrängen. Es ist aber bekannt, dass bei höheren Konzentrationen dieser kompetitiven Substanzen eine Beeinträchtigung der Bindung zwischen Hormon und Antikörper erfolgt. Bei Einsatz der erfindungsgemässen Polymermatrices ist es, vermut- 45 lich aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen, möglich, die Konzentration der kompetitiven Substanzen wesentlich, nämlich um den Faktor 100, zu erhöhen, ohne dass eine Schwächung der Bindung Hormon-Antikörper eintritt.

Der Anteil des Acrylamids im Copolymerisat kann zwischen 1 und 99 Mol-%, vorzugsweise 5 bis 95 Mol-% und insbesondere 20 bis 80 Mol-% betragen.

Besonders geeignet sind Copolymerisate aus Acrylamid und Methacrylsäure und insbesondere solche, bei denen der 55 Methacrylsäureanteil 20 bis 60 Mol-% ausmacht. Die Methacrylsäure hydrophobiert einerseits die Matrix und führt andererseits zu einem Ladungseffekt, wodurch unspezifische Bindungen der zu bestimmenden Substanzen weitgehend ausgeschaltet werden können.

Durch den Einsatz von erfindungsgemässen Copolymerisaten, die Acrylsäure oder Methacrylsäure oder deren Salze 60 enthalten, lässt sich ferner ein Neutralisationseffekt oder eine Pufferwirkung für saure bzw. alkalische Lösungen erzielen. Dies ist für zahlreiche Bestimmungen von wesentlichem Vor- 65 teil.

Als Salze der Acrylsäure bzw. Methacrylsäure werden die Alkali- und/oder Erdalkalisalze bevorzugt. Insbesondere kommen Natrium- oder Kalziumsalze in Betracht.

Als Derivate der Acrylsäure und Methacrylsäure kommen insbesondere deren Ester, beispielsweise die Methyl- und Äthylester, in Betracht.

Geeignete Derivate des Methacrylamids sind beispielsweise am Stickstoff substituierte Verbindungen, wie N-Hydroxymethylmethacrylamid.

Weitere geeignete mit Acrylamid copolymerisierbare Verbindungen sind die Derivate des Acrylamides, insbesondere am Stickstoff substituierte Verbindungen, wie N-Hydroxymethylacrylamid.

Ein Beispiel für andere mit Acrylamid copolymerisierbare Verbindungen ist N,N'-Diallyltartardiamid.

Die Immobilisierung des Antikörpers erfolgt durch Einfluss in der Polymermatrix und/oder durch kovalente Fixierung an der Polymermatrix.

Eine ausführliche Beschreibung des Radioimmunoassays findet sich beispielsweise in *Clinical Chemistry*, Bd. 19, Nr. 2, 1973, S. 145. In *Clinical Chemistry*, Vol. 19, Nr. 12, 1973, S. 1339 und *Clinical Chemistry*, Vol. 21, Nr. 7, 1975, S. 829 sind radioimmunologische Techniken beschrieben, bei denen ein immobilisierter Antikörper verwendet wird.

Die erfindungsgemässen Polymermatrices eignen sich zur Bestimmung der verschiedenen Hormone und Pharmaka, die im Serum oder Plasma zum Teil an spezifische oder nichtspezifische Bindungsproteine gebunden vorliegen. In Betracht kommen beispielsweise die Schilddrüsenhormone, insbesondere Thyroxin und Trijodthyronin, die Steroidhormone wie Cortisol, Testosteron, Progesteron, Östron, Östradiol und Östriol und die Herzglycoside, wie Digitoxin und Digoxin. Ferner können bestimmt werden Vitamine, besonders Vitamin B12 und Folsäure, sowie Pharmaka mit starker Proteinbindung, wie beispielsweise Antikoagulantien, Dicumarol, Analgetika und Salyzilate.

Neben der radioimmunologischen Bestimmung kommen gegebenenfalls auch alternative Bestimmungsmethoden, wie die fluoroimmunologische Bestimmung oder die Bestimmung mittels enzymatischer Markierung, in Betracht.

Die Synthese der Antigene, die Gewinnung von Antisera, beispielsweise durch Immunisierung von Kaninchen und die Isolierung sowie Immobilisierung der Antikörper sind bekannt (vgl. beispielsweise *Clinical Chemistry*, Bd. 19, Nr. 2, 1973, S. 146 ff.).

Die Herstellung der Polymermatrices mit dem immobilisierten Antikörper kann beispielsweise in der Art erfolgen, dass eine Lösung des Antikörpers dem Monomergemisch zugegeben wird. Der Ansatz wird beispielsweise radikalisch polymerisiert und das erhaltene Polymerisat zerkleinert, gewaschen und getrocknet.

Die Auswahl und die Mengenanteile der dem Acrylamid zugesetzten Monomere richtet sich gewöhnlich nach den gewünschten Eigenschaften der Polymermatrix bezüglich der Spezifität. Die Spezifität kann durch Änderung der Hydrophobizität und der Ladung der Matrix in weiten Grenzen beeinflusst werden. Der Zusatz von Methacrylamid erhöht die Hydrophobizität. Durch den Einsatz von Acrylsäure oder Methacrylsäure oder deren Salzen wird die Ladung der Matrix variiert. Es besteht sowohl die Möglichkeit, die Salze der Acrylsäure oder Methacrylsäure direkt dem Monomergemisch zuzusetzen oder alternativ können die Säuren polymerisiert werden und anschliessend durch Ionenaustausch die Salze in der Polymermatrix gebildet werden.

Zur Erzielung einer geeigneten Porengrösse der Polymermatrix wird im allgemeinen die Monomerkonzentration variiert. Eine Monomerkonzentration im Bereich von etwa 20% führt zu einer Porengrösse von etwa 7 bis 10 Å.

Ein vorteilhaftes Copolymerisat besteht beispielsweise aus Acrylamid und 20 bis 60 Mol-% Acrylsäure und/oder Methacrylsäure, hergestellt aus einer etwa 20%igen Monomerlösung,

wobei zumindest ein Teil der Säuregruppen in die entsprechenden Alkali- oder Erdalkalisalze überführt ist.

Die Erfindung wird nachstehend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiel

In diesem Beispiel ist der Einfluss der Polymermatrix auf die Kreuzreaktivität (K) von Östriol-3-Glucuronid und Östriol-3-Sulfat gezeigt.

Die Kreuzreaktivität K berechnet sich aus der hundertfachen Menge der benötigten Masse des korrespondierenden Haptens für $y = 50$ geteilt durch die benötigte Masse des kreuzreagierenden Haptens für $y = 50$. Die Werte sind auf der Basis von ID_{50} berechnet.

Der ausgewählte Antiöstriolantikörper zeigte eine hohe Kreuzreaktivität der 3-Glucuronid-Konjugate bzw. der 3-Sulfat-Konjugate.

Für jeden Polymerisationsansatz wurde die Konzentration so eingestellt, dass die totale Monomerkonzentration 2,9 Mol/l betrug. Für einen Ansatz wurden z.B. 5 g Acrylamid und 1,25 g N,N'-Methylenbisacrylamid in einem Becherglas in 24 ml Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2 gelöst. Nach Zumischen des Antikörpers in 1 ml Phosphatpuffer wurde die Reaktion mit 0,15 mg Riboflavin und 0,10 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin gestartet und mit UV-Licht bestrahlt. Während der Bestrahlungszeit von 45 min wurde die Temperatur unter 50 °C gehalten. Der Gelblock wurde anschliessend zerkleinert, mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

In kleinen Säulchen wurden 22 mg trockenes Antiöstriolantikörpergel eingewogen und 0,150 ml Inkubationslösung aufgezogen. Diese Inkubationslösung enthielt ^3H -Östriol und nicht markiertes Hapten (Östriol, Östriol-3-Glucuronid oder Östriol-3-Sulfat). Die Reaktionstemperatur wurde bei 0 °C konstant gehalten. Nach 30 min Inkubationszeit erfolgte die Trennung des freien vom antikörpergebundenen Haptens durch Elution mit albuminhaltigem Phosphatpuffer. Das Eluat wurde in Szintillationsgläsern aufgefangen, mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillator gemessen. Aus den Impulsen wurde die Konzentration des freien Indikatorhaptens ^3H -Östriol errechnet.

Die Ergebnisse für Bestimmungen im wässrigen System und unter Verwendung von Polymermatrices aus Acrylamid und Acrylamidcopolymeren sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst. Die angegebenen Werte sind die vorstehend definierten Werte der Kreuzreaktivität.

	wässriges System	Acrylamid	Natriumsalz der Acrylsäure/Acrylamid			Natriumsalz der Methacrylsäure/Acrylamid		
			10:90	30:70	50:50	20:80	40:60	60:40
Östriol-3-Glucuronid	61	29	19	10	14	14	4	21
Östriol-3-Sulfat	47	33	30	12	24	27	6	23

Die Ergebnisse zeigen, dass mit den Copolymerisaten gegenüber wässrigen Systemen und Acrylamidhomopolymerisaten eine bedeutende Erhöhung der Bindungsspezifität erzielt wird. Durch geeignete Auswahl des Copolymerisats kann eine Erhöhung der Spezifität um den Faktor 15 gegenüber wässrigen Systemen und um den Faktor 7 gegenüber Acrylamidhomopolymeren erzielt werden. Dies zeigt ein Vergleich der Werte

des wässrigen Systems und von Acrylamidhomopolymerisat mit einem 40/60 copolymerisat aus Methacrylsäure und Acrylamid.

Beispiel 2

Dieses Beispiel zeigt den Einsatz der erfindungsgemässen Polymermatrix bei der Gesamtbestimmung von Thyroxin durch enzymatische Hydrolyse mit Pepsin.

Die Polymermatrix für das Antikörpergel bestand aus einem Copolymerisat aus Acrylamid und 40 Mol-% des Natriumsalzes der Methacrylsäure, hergestellt aus einer 20 %igen Monomerlösung.

Es wurden 10 µl Serum mit einem Gehalt von 18 µg Thyroxin je 100 ml mit 160 µl einer Enzymlösung versetzt, die aus 2 mg/ml Pepsin gelöst in 0,1 n Salzsäure bestand.

Die Reaktion mit dem Enzym wurde bei Raumtemperatur 30 min durchgeführt.

Zu diesen 170 µl wurden anschliessend 150 µl Tracerlösung mit einem Gehalt von 5,2 ng/ml radioaktiv markiertem Thyroxin zugegeben.

Die gesamte Lösung wurde danach auf 60 mg Antikörpergel aufgebracht. Die Inkubationszeit betrug 30 min, die Temperatur 22 °C.

Die Auswertung zeigte eine ausserordentlich hohe Wiederfindung von 98%.

Beispiel 3

Dieses Beispiel zeigt den Einsatz der erfindungsgemässen Polymermatrix bei der Gesamtbestimmung von Cortisol.

Die Polymermatrix für das Antikörpergel bestand aus einem Copolymerisat aus Acrylamid und 40 Mol-% eines

Gemisches von Natrium- und Calciumsalzen der Methacrylsäure, hergestellt aus einer 20 %igen Monomerlösung.

Es wurden 10 µl Serum oder Plasma mit einem Gehalt von 15 µg Cortisol je 100 ml vorgelegt. Es wurden 500 µl Tracerlösung bestehend aus ¹²⁵J-Cortisol in wässrigem Citratpuffer pH 3,5 dazugegeben.

Die gesamte Lösung wurde danach auf 100 mg Antikörpergel aufgebracht. Die Inkubationszeit betrug 20 min, die Temperatur 25 °C.

Die Auswertung zeigte eine ausserordentlich hohe Wiederfindung von 99%.

Beispiel 4

Dieses Beispiel zeigt den Einsatz der erfindungsgemässen Polymermatrix bei der Bestimmung von Thyroxin unter Einsatz von kompetitiven Substanzen.

Die Polymermatrix für das Antikörpergel bestand aus einem Copolymerisat aus Acrylamid und 40 Mol% eines Calcium-Natriummischsalzes der Methacrylsäure, hergestellt aus einer 20 %igen Monomerlösung.

500 µl Tracerlösung bestehend aus ¹²⁵J-Thyroxin in Phosphatpuffer pH 9,6 wurden auf 80 mg Antikörpergel aufgebracht.

Ferner wurden 500 µl der gleichen Tracerlösung, die 6 mg/ml Anilinnaphtholsulfonsäure enthielt, auf 80 mg Antikörpergel aufgebracht.

Beide Proben wurden bei einer Temperatur von 22 °C 20 min inkubiert.

Die Auswertung zeigte keine Beeinträchtigung der Bindung des Thyroxins mit dem Antikörper trotz der hohen Konzentration der anwesenden kompetitiven Substanz, nämlich Anilinnaphtholsulfonsäure.