

CH 676 508 A5



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① **CH 676 508 A5**

⑤ Int. Cl.⁵: **G 01 N 33/567**

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

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

| | |
|--|---|
| ⑳ Gesuchsnummer: 4079/86 | ㉓ Inhaber: Anawa Laboratorien AG, Wangen b. Dübendorf |
| ㉒ Anmeldungsdatum: 13.10.1986 | ㉗ Erfinder: Bürgisser, Ernst, Dr., Wangen b. Dübendorf |
| ㉔ Patent erteilt: 31.01.1991 | |
| ㉕ Patentschrift veröffentlicht: 31.01.1991 | ㉘ Vertreter: Frei Patentanwaltsbüro, Zürich |

⑤④ **Einheit für einen Rezeptor-Assay im Mikromassstab und Verfahren zur Herstellung derselben.**

⑤⑦ Mit dem Verfahren wird eine Rezeptorpräparation aus biologisch aktivem Rezeptormaterial hergestellt, in dem eine Plasmamembranpräparation unter Zusatz von Zuckern und/oder Aminosäuren und/oder Proteinen lyophilisiert wird. Daraus kann eine Einheit für einen Radiorezeptor-Assay hergestellt werden, enthaltend das Co-Lyophilisat von Plasmamembran zusammen mit Zuckerverbindungen und/oder Aminosäuren und/oder Proteinen und von einer Tracersubstanz und von einer Vergleichsstandardsubstanz.

Ein Radiorezeptorassay-Kit verwendet die Einheit für einen Radiorezeptor-Assays durch Bereitstellung der Substanzen in einer Mehrzahl von Testbehältern enthaltend ein für den Assay geeignetes Co-Lyophilisat.

Beschreibung

Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der biochemischen Analysemethoden und betrifft eine Einheit für einen Rezeptor-Assay im Mikromassstab sowie ein Verfahren zur Herstellung einer solchen.

5 Gleich wie bei einem Radioimmunoassay beruht das Prinzip des Radiorezeptorassays auf der biospezifischen Erkennung eines (für den Assay gezielt eingesetzten) Liganden, bspw. ein Hormon, ein Pharmakon, ein Neurotransmitter etc., an das entsprechende Ziel- oder Empfängermolekül, bspw. ein Antikörper beim Radioimmunoassay oder ein Rezeptor beim Radiorezeptor-Assay. Durch die radioaktive Markierung eines solchen gezielt eingesetzten Liganden, erhält man ein beobachtbares Molekül, den
10 sogenannten Tracer, welcher in kompetitiver Wechselwirkung mit nicht markierten Liganden und damit den gleichartigen, aber nicht beobachtbaren Molekülen steht. Durch solche Massnahmen erhält man ein Testsystem, welches die Messung einer unbekanntenen Konzentration eines solchen Liganden erlaubt.

15 Während der Radioimmunoassay zu einer vielverwendeten Routinemethode geworden ist und heute zu den in grossem Massstab verwendeten Analysemethoden gehört, wurde dagegen der Radiorezeptor-Assay für diesen Zweck nur selten benutzt.

Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Handhabung von biologisch aktiven Rezeptoren um einiges heikler ist, als bei einem Antikörper. Die Voraussetzung für eine Routinemethode ist neben der verhältnismässig einfachen Handhabung (Einfachheit der Methode) und der damit einhergehenden Wirtschaftlichkeit vor allen Dingen die «Stabilität» der chemischen oder biologischen Reaktionspartner. Damit ist
20 die Stabilität der Analysesubstanz an sich und ihre Stabilität innerhalb der Analysenreaktion im besonderen gemeint.

Biologisch aktive Rezeptoren sind jedoch in Lösung instabil (vgl. E. Bürgisser et al., Biochem., Biophys. Res. Commun., Band 133, S. 1201 H. 1985) und müssen daher eingefroren (fest) sein bis kurz vor den analytischen Einsatz. Dazu kommt, dass sie derart instabil sind, dass auch ein kurzer Ausfall dieser
25 Bedingung den Rezeptor unbrauchbar machen kann. Es liegt wohl auf der Hand, dass solche sensiblen Eigenschaften geeignet sind, einem an und für sich brauchbaren Analysemechanismus den Einzug unter die Routinemethoden zu verwehren.

Es ist daher das Ziel der Erfindung, einen Weg anzugeben, um diese empfindlichen Substanzen einer einfachen Routinemethode zuzuführen, welche Methode einfachst ausführbar ist, wobei die bisher verwendeten Massnahmen wie Einfrieren etc. mit all den Umständlichkeiten, Nachteilen und Risiken vermieden werden sollen.

Dieses Ziel wird erreicht, durch die in den unabhängigen Patentansprüchen angegebene Einheit für einen Rezeptor-Assay und das Verfahren zur Herstellung derselben.

35 Erreicht soll werden, dass sich alle oder möglichst viele Reaktionspartner zusammen in einem gemeinsamen Gefäss befinden können und die Ingangsetzung der Bindungsreaktion mit möglichst einem einzigen Pipettierschritt durchgeführt wird, wobei ausser dem zu analysierenden Material alle Reaktionsteilnehmer in stabiler Form bspw. in einem Teströhrchen zur Verfügung stehen. Herkömmliche analoge Verfahren benötigen in der Regel 3 bis 4 Pipettierschritte, so dass der durch die Erfindung ermöglichte Einmalvorgang einen ökonomisch (bezgl. Geschwindigkeit der Testdurchführung, Präzision und Arbeitsaufwand) erheblichen Fortschritt in dieser Art Analysetechnik darstellt. Ausserdem kann durch die Erfindung ein Testkit geschaffen werden, der ohne Einbusse an Qualität bei Umgebungs- oder Kühl-
40 schranktemperatur (kein Einfrieren) gelagert werden kann, was u.a. besonders beim Transport von Wichtigkeit ist, da das bis anhin benötigte Trockeneis für den Transport entfällt.

Die Präparation von rezeptorhaltigen Plasmamembranen wird gemäss den in der Fachliteratur angegebenen Methoden durchgeführt, zum Beispiel gemäss Angaben E. Bürgisser et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Bd. 133, p. 1201–1209, 1985. Dies beinhaltet die Gewinnung von geeignetem Gewebematerial oder Zellen, z.B. Blutzellen oder Zellkulturen. Danach erfolgt ein Zellaufschluss mittels Homogenisation, Ultraschall oder einer anderen geeigneten Vorgehensart, mit anschliessender Trennung von cytoplasmatischen (löslichen) Bestandteilen sowie eine Separierung von gröberen Partikeln, bspw. durch
50 zentrifugieren, filtrieren etc.. Die somit gewonnene Plasmamembranpräparation kann nun in einem Radiorezeptor-Assay verwendet werden.

Bis anhin wurde diese Präparation gleich für den Gebrauch in einem Assay hergestellt oder sie wurde tiefgefroren und im tiefgefrorenen Zustand bis zum Gebrauch aufbewahrt. Hier setzt nun das erfindersche Abweichen vom üblichen Vorgehen ein.

55 An Stelle einer Haltbarmachung durch Tiefrieren wird die Präparation lyophilisiert, also gefriergetrocknet. Dieser Schritt führt jedoch nur dann zum Ziel, nämlich zur Erhaltung der biologischen Aktivität der Rezeptoren (das Erhalten ihrer Bindungsfähigkeit) in einem stabilen und wenig sensiblen Endprodukt, das nach beliebiger Zeitdauer eingesetzt werden kann, wenn der Membranpräparation geeignete Zusatzstoffe beigegeben werden. Eine Gefrierd Trocknung an und für sich führt nicht zum Gelingen, d.h.,
60 zu einem brauchbaren biologisch aktiven Analyseprodukt.

Diese Zusatzstoffe sollen folgende Eigenschaften aufweisen:

1. Sie sollen chemisch und biochemisch inert sein, damit ist gemeint, dass sie keine Reaktionspartner des Testsystems sind und dieses nicht beeinflussen sollen.

65 2. Sie sollen eine möglichst geringe bis gar keine Hygroskopizität aufweisen.

3. Sie sollen in den für den Assay verwendeten Lösungsmitteln, also in den Lösungsmitteln, die zur Auflösung des lyophilisierten Präparats verwendet werden, ebenfalls lösbar sein.

4. Fakultativ sollen sie ferner bewirken, dass das Lyophilisat eine eher voluminöse und kompakte Masseform annimmt, welche, so sie direkt im Testgefäss lyophilisiert wird, auch bei grösserer mechanischer Einwirkung (Schütteln beim Postversand) fest mit der Gefässwand verbunden bleibt.

Solche Substanzen sind:

Zuckerverbindungen und deren Derivate, vorzugsweise Monosaccharide, wie Mannit, Glucose, Fructose, und weitere Aldosen und Ketosen, sowie Disaccharide wie Lactose, Saccharose sowie schwach reaktive Aminosäuren wie Glycin etc. und/oder zusätzlich Albumine, vorzugsweise bovines Serumalbumin. Ferner lösliche Polysaccharide und Kollagene, bspw. Gelatine.

Beispiel 1:

Eine für die Lyophilisation von Plasmamembranen geeignete wässrige Lösung besteht bspw. aus

| | |
|------------------------|----------------------|
| – Tris-Puffer | 50 mM, pH 7.6 |
| – Bovines Serumalbumin | 0.5% |
| – D-Mannit | 2% |
| – Stabilisatoren | Anteil gemäss System |

Die einzusetzenden Stabilisatoren sind hauptsächlich in Flüssigphase nötig, dies betrifft den Zustand der Präparation vor der Lyophilisierung und während der Inkubation in der Analyse. Bei Substanzen mit leichter Hygroskopizität besteht die Gefahr einer vorzeitigen partiellen Reaktion und/oder Degeneration im Lyophilisat. Die Stabilisatoren sind bspw. Proteaseninhibitoren, bspw. Aprotinin (Trasyol), Leupeptin etc. sowie Antioxydantien, bspw. Dithiothreitol (DTT) etc. Bakteriostatika, bspw. Natriumazid, Thimerosal und auch Komplexe, bspw. EDTA, EGTA. Ihr Einsatz hängt sehr stark vom jeweiligen Assay-System ab, das präpariert wird und sollte für jedes einzelne Testsystem evaluiert und optimiert werden. Die Kriterien dafür entsprechen der üblichen Stabilisierung von biologisch aktiven Komponenten, wie sie in den herkömmlichen Verfahren bereits benutzt werden.

Beispiel 2:

| | |
|------------------------------|---------------|
| – Phosphatpuffer | 50 mM, pH 7.4 |
| – Humanes Serumalbumin | 0.2% w/v |
| – Lactose | 5% w/v |
| – Glycerin | 0.5% w/v |
| – Natriumazid (Stabilisator) | 0.01% w/v |

Beispiel 3:

| | |
|------------------------|---------------|
| – HEPES-Puffer | 20 mM, pH 7.4 |
| – Gelatine | 1% w/v |
| – Glycin | 2% w/v |
| – Komplexon III (EDTA) | 2 mM |

Eine aus dem oben angegebenen Verfahren abgeleitete Variante ist folgende. Die Vereinfachung des Assays liegt in der Anwendung mittels eines möglichst einzigen (Pipettier-) Schrittes, bspw. das Umsetzen des Lyophilisats in flüssige reaktionsfähige Form. Besteht ein Kit aus mehreren Reaktionspartnern, so können durch Co-Lyophilisieren diese Reaktionsteilnehmer miteinbezogen werden. Die trockene Mischung wird dann mit der zu bestimmenden Probe aufgelöst und damit die Reaktion in Gang gesetzt. Vorteilhafterweise wird die Zusammensetzung in einem Teströhrchen oder Nöpfchen von Mikrottestplatten in richtiger Menge und Zusammensetzung lyophilisiert.

Um eine ungewollte Vorinkubation bei der Herstellung des Lyophilisats zu vermeiden, werden die einzelnen Komponenten sequentiell im Reaktionsgefäss eingebracht werden. Dies geschieht bspw. folgendermassen: jede im Assay reaktive Komponente wird sequentiell im Testbehälter tiefgefroren, um eine Durchmischung in flüssiger Phase zu vermeiden. Vorteilhafterweise wird zwischen zwei reaktive Komponenten eine nichtreaktive Trennschicht gleichermaßen eingeführt. Solche Trennschichten bestehen

bspw. aus der in Beispiel 1 beschriebenen Lösung oder Puffersubstanz. Diese Zugaben erfolgen direkt in den Testbehälter, welche den aliquotierten Assay enthalten soll und dem Anwender zum direkten Verbrauch zur Verfügung gestellt wird. Das nachfolgende Lyophilisieren geschieht natürlich auch in diesen Testbehältern, welche anschliessend adäquat verpackt werden.

5 Eine solche zur Co-Lyophilisierung vorbereitete Mischung besteht aus folgenden Teilen,

Beispiel 4: (Co-Lyophilisat qualitativ)

- Plasmamembranpräparation
- 10 – Tracersubstanz
- evtl. ein Standard
- evtl. Stabilisatoren und/oder Modulatoren
- evtl. Farbstoffe zur visuellen Unterscheidung von verschiedenartig präparierten Tests.
- Lyophilisationsmedium gemäss Beispiel 1 oder Beispiel 2.

15 Die Modulatoren beeinflussen die Bindungseigenschaften von Liganden an die Rezeptoren. Dafür werden die adäquaten Substanzen für jeden Assay jeweils ausgewählt. So verbessert bspw. die Substanz Amiloride die Bindungsaffinität von ANF an den Plasmamembranrezeptor aus bovinen Nebennierenrinde (Lit. A. DeLean, Lf.sei. 39, 1109–1116, 1986).

20 Beispiel 5: (Co-Lyophilisat quantitativ)

- Plasmamembran aus Rindernebennierenrinde 10mg/Test biologische Ausgangsmasse.
- Tracer: Jod-125 markiertes ANF, ANP (Atrial Natriuretic Factor, Peptide) 20 000 cpm [counts per minute]
- 25 – Standard ANF (Verdünnungsreihe, nur in einem Teil des Testkits, bspw. 16 von 96 Nöpfchen einer Mikrottestplatte.
- Phenanthrolin (Stabilisator) 1 mM
- Farbstoff für die Markierung der Standardreihe: Evans Blue (Konzentration gemäss gewünschter Intensität)

Die einzelnen Komponenten werden vorzugsweise im Lyophilisationsmedium (50 mM Tris-Puffer, pH 7.6, 0.5% w/v BSA, 2% w/v Mannit) gelöst und wie oben beschrieben sequentiell eingefroren.

- 35 Die Lyophilisierung wird gemäss bekannten Verfahren ausgeführt, dabei ist darauf zu achten:
 - dass sich die eingefrorenen Komponenten auch nicht kurzfristig verflüssigen können;
 - dass die Lyophilisation komplett ist und keine Restfeuchtigkeit zurückbleibt;
 - der Testbehälter, Röhrchen, Mikrottestplatten werden gleich, nachdem sie aus dem Lyophilisator entnommen werden gegen den Zutritt von Feuchtigkeit abgeschlossen. Vorzugsweise wird der Testbehälterinhalt mit einem trockenen Inertgas z.B. Stickstoff oder Argon gefüllt.

40 Eine gemäss erfinderischem Verfahren hergestellte Einheit für einen Radiorezeptor-Assay zeichnet sich durch folgende Grundzusammensetzung aus:

Die rezeptorhaltige Plasmamembranpräparation liegt in lyophilisierter Form vor, wobei die vorgängig zugefügten Trägersubstanzen (Zusatzstoffe) dafür sorgen, dass das Trockengemisch nach erfolgter Rekonstitution im Assaypuffer sofort und ohne mechanische Einflussnahme (Rühren etc.) in eine homogene Lösung übergeht. Das Lyophilisat zeichnet sich durch eine relativ voluminöse Masse aus, welche vom Fachmann leicht als typisches Lyophilisat erkannt werden kann.

45 Die lyophilisierte Membranpräparation liegt als Co-Lyophilisat mit anderen Reaktionsteilnehmern vor. Dabei kann in einem Assay-Kit die lyophilisierte Membranpräparation entweder in einem einzigen Gefäss oder aber bereits aliquotiert in den Testbehältern vorliegen.

50 Das Verfahren eignet sich nicht nur für eine Testdurchführung in Röhrchen, sondern eignet sich in hervorragender Weise für den Einsatz von Mikrottestplatten, welche einen hohen Automationsgrad ermöglichen.

Ein handelsüblicher Assay-Kit besteht beispielsweise aus einer oder mehreren Mikrottestplatten von je 96 Vertiefungen, welche gegen das Eindringen von Feuchtigkeit zum Beispiel mittels dafür geeigneten Klebefolien abgeschlossen sind. Dank der Geometrie von Mikrottestplatten (flacher Körper) kann ein solcher Kit problemlos mittels Briefpost versandt werden. Ausserdem entfällt die bis anhin aufwendige und teure Versandart mit Kühlmittel (Trockeneis).

60 Patentansprüche

1. Einheit für einen Rezeptor-Assay im Mikromassstab, mit
 - a) einer gefriergetrockneten Mischung aus
 - aa) einer Plasmamembranpräparation, welche Rezeptoren enthält,
 - ab) einer markierten Ligandensubstanz, welche mit den Rezeptoren der Plasmamembranpräparation
 - 65 wechselwirken kann, und

- ac) mindestens einem Schutzstoff, der aus folgender Gruppe ausgewählt ist: Zucker, Aminosäuren, Proteine und Mischung der vorgenannten Substanzen;
b) einem Röhrchen oder Näpfchen, welches die gefriergetrocknete Mischung enthält und feuchtigkeitsdicht verschlossen ist.
- 5 2. Einheit nach Anspruch 1, bei welcher die gefriergetrocknete Mischung zusätzlich eine Vergleichs-
substanz enthält.
3. Einheit nach Anspruch 1 oder 2, bei welcher die gefriergetrocknete Mischung mindestens einen
Stabilisator, wie z.B. Phenanthrollin, enthält.
- 10 4. Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei welcher die gefriergetrocknete Mischung mindestens
einen Modulator enthält.
5. Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei welcher die gefriergetrocknete Mischung einen Farb-
stoff enthält.
6. Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei welcher die Röhrchen oder Näpfchen zu einer Mikro-
testplatte gehören.
- 15 7. Verfahren zur Herstellung einer Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei welchem
a) eine erste Lösung hergestellt wird, die die Plasmamembranpräparation und die Schutzstoffe enthält;
b) eine zweite Lösung hergestellt wird, die die markierte Ligandensubstanz enthält;
c) eine kleine, genau dosierte Menge einer der beiden Lösungen in das Röhrchen oder Näpfchen ein-
gebracht und dort gefroren wird;
- 20 d) eine kleine genau dosierte Menge der anderen der beiden Lösungen über der ersten gefrorenen
Schicht im Röhrchen oder Näpfchen gefroren wird;
e) die so erhaltene Schichtstruktur gefriergetrocknet wird; und
f) das Röhrchen oder Näpfchen feuchtigkeitsdicht verschlossen wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, bei welchem auf die gefrorene erste Schicht im Röhrchen oder Näpf-
chen eine nicht reaktive Trennschicht aufgefroren wird, bevor die andere der beiden Lösungen aufge-
froren wird.
- 25 9. Verfahren nach Anspruch 8, bei welchem die nicht reaktive Trennschicht aus dem Lösungsmittel
der ersten Lösung besteht.
10. Verfahren nach Anspruch 8, bei welchem die nicht reaktive Trennschicht aus Pufferlösung be-
steht.
- 30 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, bei welchem eine dritte Lösung, die die Vergleichs-
substanz enthält, auf die gefrorene zweite Schicht aufgefroren wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, bei welchem auf die zweite gefrorene Schicht eine nicht reaktive
Trennschicht aufgefroren wird, bevor die dritte Lösung aufgefroren wird.
- 35 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, bei welchem die dritte Lösung zusätzlich einen Farbstoff ent-
hält.
14. Verfahren nach Anspruch 7, bei welchem die erste Lösung eine wässrige Mischung aus Plasma-
membranpräparation und 0,1 bis 10% w/v Mannit und/oder 0,1 bis 1,0% w/v Serumalbumin vom Menschen
oder Rind ist.
- 40 15. Verfahren nach Anspruch 7, bei welchem die erste Lösung eine wässrige Mischung aus Plasma-
membranpräparation und 0,1 bis 10% w/v Glycin und/oder 0,1 bis 1,0% w/v Serumalbumin vom Menschen
oder Rind ist.

45

50

55

60

65