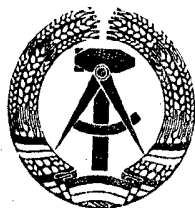


(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

202 178

Int.Cl.³

3(51) C 12 Q 1/18

C 12 Q 1/04

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 Q/ 2394 781
(31) 67333-1981

(22) 30.04.82
(32) 02.05.81

(44) 31.08.83
(33) JP

(71) siehe (73)

(72) TSUTSUI, SATOSHI;SUDO, TADAMITSU;ITO, MICHIO;JP;

(73) MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES LTD; TOKIO, JP

(74) PAB (PATENTANWALTSBUERO BERLIN) 1501258 1130 BERLIN FRANKFURTER ALLEE 286

(54) VERFAHREN UND REAGENS ZUR UNTERSUCHUNG VON ANTIGEN-ANTIKOERPER-REAKTIONEN

(57) Es werden ein Verfahren zur Untersuchung bzw. Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern in einem Reaktionsmedium, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß eine die zu bestimmenden Antigene oder Antikörper enthaltende Probe mit einem in dem Reaktionsmedium löslichen Polyanion behandelt und die in dieser Weise behandelte Probe zur Durchführung der Antigen-Antikörper-Reaktion verwendet wird, und ein Reagens zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen, welches ein Polyanion und ein Reaktionsmedium enthält, beschrieben.

239478 1 - 1 -

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen, bei dem das zu bestimmende Antigen oder der zu bestimmende Antikörper in einer Reaktionsmischung mit dem entsprechenden Antikörper bzw. Antigen umgesetzt wird, sowie ein hierfür geeignetes Reagens.

10 Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Zur Zeit finden viele in vivo-Reaktionen im Hinblick auf ihre Beziehung zu Antigen-Antikörper-Reaktionen Interesse, insbesondere auf dem Gebiet der Medizin und der Hygienewissenschaft und werden mit der Absicht, die Volksgesundheit zu bessern, Krankheiten zu behandeln und dergleichen untersucht. Weiterhin werden im Hinblick auf in vitro-Reaktionen immunochemische Untersuchungen in intensivem Maßstab auf der Grundlage von Proben durchgeführt, welche den in vivo-Zustand erkennen lassen, wobei diese Methoden zum Teil bereits für medizinische Routineuntersuchungen in der Praxis angewandt werden. Typische Untersuchungsmethoden, die als hochempfindliche Untersuchungssysteme oder Analysensysteme bekannt sind, schließen den Radioimmunoassay (RIA), den Latexagglutinationsassay mit turbidimetrischer Messung im nahen Infrarotbereich (LPIA), den Enzymimmunoassay (EIA), den Fluoroimmunoassay und die Nephelometrie, die die Lichtstreuung anwendet, ein. Bislang wurden viele immunologische Reaktionen in der Weise durchgeführt, daß in Proben vorhandene Antigene oder Antikörper mit einem Reagens nachgewiesen werden, welches neben der flüssigen Phase eine Trägermatrix, wie biologische Träger, beispielsweise Erythrozyten oder Bakterien und Latexteilchen eines synthetischen organischen Polymerträgers, die mit einem geeig-

neten Antikörper oder Antigen sensibilisiert werden können, enthalten.

5 Immunologische Reaktionen sind äußerst spezifisch, indem die Reaktionen strikt und selektiv ablaufen, was eines ihrer herausragenden Merkmale ist, und stellen daher wichtige medizinische Untersuchungsmethoden dar.

10 Andererseits besitzen Körperflüssigkeiten, die die Aktivität von in vivo-Bedingungen widerspiegeln, eine große Vielfalt in ihrer Zusammensetzung und in ihren physikalischen Eigenschaften. Aus diesem Grund konnten viele immunologische Reaktionen nicht vollständig von nichtspezifischen Reaktionen befreit werden, von denen gesagt werden
15 kann, daß sie von der Antigen-Antikörper-Reaktion unabhängige Nebenreaktionen darstellen. Als Gegenmaßnahme gegen solche nichtspezifischen Reaktionen werden in vielen Fällen Maßnahmen, wie die Zugabe von Kaolin oder eines ähnlichen Adsorbens oder eine Extraktion angewandt, um die relevanten nichtspezifischen Faktoren zu entfernen oder zu
20 neutralisieren. Wenngleich manche dieser Maßnahmen wirksam sind, ist es erforderlich, bezüglich jeder Antigen-Antikörper-Reaktion eine detaillierte Untersuchung durchzuführen und darüber hinaus bereiten sie in ihrer praktischen
25 Anwendung viele Schwierigkeiten.

Ziel der Erfindung:

30 Bei Anwendung des Verfahrens und des Reagens der vorliegenden Erfindung wird es im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden möglich, die Gewinnung der nachzuweisenden Substanz zu verbessern und die Genauigkeit der Untersuchung zu steigern.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Die dem Anmeldungsgegenstand zugrunde liegende Aufgabe besteht somit darin, ein Verfahren und ein Reagens zur Untersuchung bzw. zur Bestimmung von Antigen-Antikörper-Reaktionen anzugeben, mit denen es gelingt, die Nachteile der herkömmlichen Methoden zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen zu überwinden, deren praktische Anwendung zu vereinfachen und ihre Genauigkeit zu verbessern.

10

Diese Aufgabe wird nun gelöst durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Untersuchung oder Bestimmung oder zur Analyse von Antigen-Antikörper-Reaktionen, bei dem das zu bestimmende Antigen oder der zu bestimmende Antikörper in einer Reaktionsmischung mit dem entsprechenden Antikörper bzw. Antigen umgesetzt wird und das dadurch gekennzeichnet ist, daß die das zu bestimmende Antigen oder den zu bestimmenden Antikörper enthaltende Probe mit einem in dem Reaktionsmedium löslichen Polyanion behandelt wird und die behandelte Probe zur Durchführung der Reaktion verwendet wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein für die Durchführung dieses Verfahrens, d. h. zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen geeignetes Reagens, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es ein Polyanion und ein Reaktionsmedium enthält.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann man als Polyanionen Substanzen verwenden, wie natürliche oder synthetische Polymere, wie Polysaccharide oder Polystyrol, die eine Vielzahl von Anionen, wie Sulfonylanionen oder Carboxylanionen tragen und welche Materialien in dem für die Antigen-Antikörper-Reaktion verwendeten Reaktionsmedium löslich sind.

35

Spezifische Beispiele für diese Polyanionen sind Dextran-sulfat, Heparin, Polystyrolsulfonsäure, Cellulosephthalacetat, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und dergleichen.

5

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die das zu bestimmende Antigen oder den zu bestimmenden Antikörper enthaltende Probe mit dem Polyanion behandelt und dann mit dem entsprechenden Antikörper bzw. Antigen in dem Reaktionsmedium der Antigen-Antikörper-Reaktion unterworfen.

10

Die Behandlung mit dem Polyanion kann in der Weise durchgeführt werden, daß man

(i) die Antigen-Antikörper-Reaktion in dem Medium durchführt, in das das Polyanion eingebracht worden ist, oder
(ii) die Probe vor der Durchführung der Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer das Polyanion enthaltenden festen oder flüssigen Phase behandelt,

15

(wobei in letzterem Fall die in dieser Weise behandelte antigen- oder antikörperhaltige Probe der Antigen-Antikörper-Reaktion unterworfen werden kann, nachdem man das Polyanion entfernt hat, wengleich sie normalerweise in Gegenwart des Polyanions der Reaktion unterworfen wird).

20

Die für die Antigen-Antikörper-Reaktion geeigneten Reaktionsmedien sind wäßrige Medien, wie beispielsweise Wasser, Salzlösungen und Pufferlösungen, die einen oder mehrere Hilfsstoffe, wie Stabilisatoren, Konservierungsmittel, Chelatbildner, oberflächenaktive Mittel etc. enthalten können.

30

Als Pufferlösung kann man Glycinpuffer, Phosphorsäurepuffer, Zitronensäurepuffer, Barbitursäurepuffer, Boratpuffer, Tris/Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/Chlorwasserstoffsäure-Puffer, Tris-Malatpuffer, Ammoniakpuffer und

35

dergleichen verwenden.

Als Stabilisatoren kann man beispielsweise Aminosäuren, Polypeptide, Proteine und dergleichen, die an der betreffenden immunologischen Reaktion nicht teilnehmen, verwenden, wobei diese Materialien üblicherweise in Konzentrationen von 0,001 bis 1 % und vorzugsweise von 0,05 bis 0,6 % vorhanden sind.

- 10 Bevorzugte Beispiele für Konservierungsmittel sind Natriumazid und Merthiolate.

Bevorzugte Beispiele für Chelatbildner umfassen Äthylen-diamintetraessigsäure, Nitrilotriessigsäure, Cyclohexan-diamintetraessigsäure und dergleichen.

Als oberflächenaktive Mittel sind im allgemeinen nicht-ionische oberflächenaktive Mittel bevorzugt.

- 20 Der pH-Wert des Reaktionsmediums sollte in dem üblichen pH-Bereich liegen, der für Antigen-Antikörper-Reaktionen geeignet ist, so daß im allgemeinen ein pH-Wert von etwa 5 bis 10 angewandt wird.

- 25 Die Konzentration des Polyanions in dem Reaktionsmedium ist im allgemeinen nicht größer als 5 Gew.-% und liegt vorzugsweise im Bereich von 0,001 bis 0,5 Gew.-%. Bei höheren Konzentrationen kann die Reaktion im Fall bestimmter Untersuchungssysteme instabil werden, während
30 bei einer niedrigeren Konzentration die inhibierende Wirkung gegen die sogenannten nichtspezifischen Reaktionen, die die Untersuchungsmethode stören und es unmöglich machen, genaue Analysenwerte zu erzielen, vermindert wird als Folge eines erhöhten inhibierenden Effekts von Faktoren
35 in der Serumprobe, die von denen verschieden sind,

die bei der Reaktion mit dem entsprechenden Antigen benötigt worden, was eine verminderte Genauigkeit der Untersuchungsmethode zur Folge hätte.

- 5 Die als zu bestimmende Substanz und als Reaktionsteilnehmer zu verwendenden Antigene schließen verschiedene Materialien ein, beispielsweise Proteine, Polypeptide, Steroide, Polysaccharide, Lipide, Pollen, Staub und Haptene. Die Antikörper umfassen beispielsweise jene Proteine, die
10 Antikörper für die oben angesprochenen Antigene darstellen.

Die Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann nach irgendwelchen an
15 sich bekannten Untersuchungssystemen erfolgen. Somit kann das Verfahren entweder auf die sogenannten Lösungssysteme angewandt werden, bei denen sowohl die zu bestimmende Substanz als auch das Reagens in dem Reaktionsmedium löslich sind oder kann auch in sogenannten Trägersystemen durchgeführt werden, bei denen der Reaktionsteilnehmer auf einem
20 teilchenförmigen Träger vorliegt, welcher im wesentlichen in dem Reaktionsmedium unlöslich ist, was bedeutet, daß der teilchenförmige Träger mit dem Reaktionsteilnehmer sensibilisiert ist. Spezifische Beispiele für Antigen-
25 Antigenkörper-Reaktionen, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren untersucht werden können, schließen jene Reaktionen ein, die in dem Radioimmunoassay, bei der Latexagglutination unter Anwendung der Turbidimetrie (oder Trübungsmeßtechnik) im nahen Infrarotbereich, dem Enzym-
30 immunoassay, dem Fluoroimmunoassay, der Immunonephelometrie unter Anwendung der Lichtstreuung, der Erythrozytenagglutination, der Latexagglutination und dergleichen auftreten. Vorzugsweise wendet man das erfindungsgemäße Verfahren auf ein Untersuchungssystem, wie die Latex-
35 agglutination mit einer turbidimetrischen Bestimmung im

239478 1 - 7 -

nahen Infrarotbereich an, bei dem beispielsweise eine umgekehrte passive Agglutination ausgenutzt werden kann.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können nicht-spezifische Reaktionen, die bei Antigen-Antikörper-Reaktionen ablaufen können, verhindert werden, so daß genauere Untersuchungsergebnisse erhalten werden können.

Ausführungsbeispiele:

10

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung, ohne diese jedoch einzuschränken.

Die angegebenen Prozentsätze sind dabei auf das Gewicht bezogen.

B e i s p i e l 1

Dieses Beispiel verdeutlicht die Latexagglutination unter Anwendung einer turbidimetrischen Messung im nahen Infrarotbereich.

Zu 50 μ l normalen Humanserums, welches nicht mehr als 2 ng/ml α_1 -Fetoprotein (AFP) enthält, gibt man zur Bildung der Testlösung 50 μ l einer 1 μ g/ml AFP enthaltenden Lösung und dann 100 μ l einer Rinderserumalbumin-Salzlösung, welche Dextransulfat enthält. Zu 50 μ l der Testlösung gibt man 50 μ l eines mit Anti-AFP-Antikörpern sensibilisierten Latexreagens und 200 μ l einer Pufferlösung und mißt die Änderung der Trübung im nahen Infrarotbereich bei 940 nm unter Rühren. Der gemessene Wert der Probe wird auf einer Eichkurve abgelesen und es wird der Erfassungsprozentsatz berechnet. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle I im Vergleich zu einem polyanionen-

35 freien Kontroll-Reaktionssystem angegeben.

Wie aus der Tabelle I zu erkennen ist, wird durch die Zugabe von Dextransulfat (bei einer Endkonzentration von 0,1 %) eine signifikante Verbesserung des Erfassungsprozentsatzes ($P < 0,01$) erreicht, wobei auch eine deutliche Verbesserung des Varianzkoeffizienten (CV) erreicht wird. Dabei entspricht der Erfassungsprozentsatz dem relativen Wert der Erfassung bezogen auf normalem gepooltem Serum von zehn klaren, trübungsfreien Proben, deren Wert als 100 angesetzt wird.

10

B e i s p i e l 2

Man wiederholt die Maßnahmen des Beispiels 1 mit dem Unterschied, daß man als Polyanion Polystyrolsulfonsäure mit einer Endkonzentration von 0,2 % verwendet. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind ebenfalls in der Tabelle I angegeben, aus der zu erkennen ist, daß eine deutliche Verbesserung des Varianzkoeffizienten erreicht wird.

20 B e i s p i e l 3

Man wiederholt die Maßnahmen des Beispiels 1 mit dem Unterschied, daß man als Polyanion Heparin in einer Endkonzentration von 0,1 % anwendet. Wie in der Tabelle I angegeben ist, ist auch hier eine Verbesserung der Erfassung festzustellen.

B e i s p i e l 4

30 Man wiederholt die Maßnahmen des Beispiels 1 mit dem Unterschied, daß als Polyanion Cellulosephthalatacetat in einer Endkonzentration von 0,1 % angewandt wird. Wie aus der Tabelle I hervorgeht, wird eine Verbesserung der Erfassung erreicht.

35

239478 1

- 9 -

TABELLE I

In- satz Nr.	Probe		Kontrolle Kein Poly- anion	Erfassungprozentatz (%)			
	Hämo- lysis	Trü- bung		Beispiel 1 Dextran- sulfat	Beispiel 2 Polystyrol- sulfonsäure	Beispiel 3 Heparin	Beispiel 4 Cellulose- phthalatacetat
1	-	+++	93,7	101,4	93,9	96,2	98,3
2	-	+++	86,8	88,8	88,2	88,9	88,9
3	-	+++	83,8	105,8	80,2	87,2	82,9
4	++	+++	88,0	96,5	90,0	92,2	93,2
5	-	+++	76,7	86,6	80,3	82,3	85,2
6	-	+	84,6	98,1	85,2	87,8	91,2
7	-	+	90,7	103,3	93,4	93,5	98,5
8	-	+	85,9	103,0	86,8	85,9	91,7
9	-	+	72,9	96,2	85,0	82,4	91,7
0	-	+	100,6	100,6	100,0	99,8	101,7
1	-	+	105,1	100,4	89,9	100,2	111,2
2	++	+	92,7	101,0	94,3	102,0	98,4
3	+	+	96,5	99,1	97,8	100,0	101,2
4	+	+	92,4	97,5	95,2	99,0	101,2
5	-	+	100,0	100,2	97,5	102,0	101,5
6	+	+	79,6	93,1	80,4	85,0	88,4
7	-	-	95,6	100,1	95,5	99,4	100,9
8	+	-	81,1	93,2	87,5	85,5	93,5

TABELLE I (Fortsetzung)

An- satz Nr.	Probe		E r f a s s u n g s p r o z e n t s a t z (%)				
	Hämo- lysis	Trü- bung	Kontrolle Kein Poly- anion	Beispiel 1 Dextransul- fat	Beispiel 2 Polystyrol- sulfonsäure	Beispiel 3 Heparin	Beispiel 4 Cellulose- phthalacetat
19	+++	-	82,6	85,5	83,7	87,0	86,0
20	-	-	92,0	105,1	97,2	102,0	98,0
Durchschnittswert			89,07	97,78	90,1	92,92	95,18
Standardabweichung			+ 8,39	+ 5,76	+ 6,33	+ 7,21	+ 7,07
CV (%)			9,42	5,89	7,02	7,76	7,43

B e i s p i e l 5

Dieses Beispiel verdeutlicht den Effekt der Zugabe von Dextransulfat auf die Erythrozyten-Agglutination, die bei manchen Proben von einer Pseudo-Reaktion begleitet werden kann, die zu falschen Analysenwerten führt.

Man verdünnt eine AFP enthaltende Probe mit einer Lösung von Dextransulfat in einem Phosphatpuffer (pH = 6,4), die so eingestellt ist, daß die Endkonzentration des Dextransulfats 0,001 % beträgt um den Faktor 20 und gibt 100 µl der verdünnten Probe zu einer Suspension von Schaf-Erythrozyten, die mit Anti-AFP-Antikörpern sensibilisiert worden sind. Man läßt die Mischung während 2 Stunden stehen. Die Proben, die nicht mehr als 50 ng/ml AFP enthalten, zeigen eine ringförmige Agglutination, während jene Proben, die nicht weniger als 100 ng/ml AFP enthalten, entweder eine offensichtlich größere ringförmige oder matte Agglutination zeigen. Wenn man die gleiche Untersuchung mit Proben bekannter Konzentration wiederholt, so treten selbst im Fall von stark trüben Proben, die die Bewertung erleichtern, weniger Pseudo-Reaktionen auf.

239478 1 - 12 -

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen, bei dem das zu bestimmende Antigen oder der
5 zu bestimmende Antikörper in einer Reaktionsmischung mit dem entsprechenden Antikörper bzw. Antigen umgesetzt wird, da durch gekennzeichnet, daß die das zu bestimmende Antigen oder den zu bestimmenden Antikörper enthaltende Probe mit einem in dem Reaktionsmedium
10 löslichen Polyanion behandelt wird und die behandelte Probe zur Durchführung der Reaktion verwendet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, da durch gekennzeichnet, daß die Reaktion in Gegenwart
15 des Polyanions durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, da durch gekennzeichnet, daß als Polyanion Dextran-
sulfat verwendet wird.
20
4. Verfahren nach Punkt 1, da durch gekennzeichnet, daß die Antigen-Antikörper-
Reaktion eine Agglutinationsreaktion ist.
- 25 5. Verfahren nach Punkt 4, da durch gekennzeichnet, daß die Agglutinationsreaktion eine umgekehrte passive Agglutinationsreaktion ist.
6. Reagens zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-
30 Reaktionen, da durch gekennzeichnet, daß es ein Polyanion und ein Reaktionsmedium für die Antigen-Antikörper-Reaktion enthält.
7. Reagens nach Punkt 6, da durch gekennzeichnet, daß es als Reaktionsmedium ein
35

239478 1 - 13 -

wäßriges Medium enthält.

8. Reagens nach Punkt 6, dadurch gekennzeichnet, daß es als Reaktionsmedium eine Puffer-
5 lösung enthält.