



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



⑫ PATENTSCHRIFT A5

617 774

⑪ Gesuchsnummer: 16216/71

⑬ Inhaber:  
N.V. Organon, Oss (NL)

⑫ Anmeldungsdatum: 08.11.1971

⑫ Erfinder:  
Dr. Antonius Hermanus W.M. Schuurs, Oss (NL)  
Bauke Klaas van Weemen, Oss (NL)

⑭ Patent erteilt: 13.06.1980

⑭ Vertreter:  
Fritz Isler, Patentanwaltsbureau, Zürich

⑮ Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von einem Hapten oder einem entsprechenden Antikörper.

⑯ Haptene oder entsprechende Antikörper lassen sich qualitativ und quantitativ bestimmen, indem man einer Flüssigkeitsprobe, z.B. einer Körperflüssigkeit, eine vorbestimmte, bekannte Menge des Kupplungsproduktes des Haptens mit einem Enzym und eine vorbestimmte, bekannte Menge des Haptens bzw. dessen Antikörper in Form eines unlöslichen Präparates zusetzt. Das Hapten reagiert hierbei mit dem Antikörper. Die flüssige Phase wird sodann von der festen Phase getrennt und die Enzymaktivität in einer dieser Phasen qualitativ oder quantitativ bestimmt. Diese Aktivität ist ein Mass für die Menge der gesuchten Verbindung, die sich anhand von Bestimmungskurven ablesen lässt. Die Bestimmung ist einfach und benötigt keine komplizierten Apparaturen. Sie lässt sich z.B. mit einer Testpackung ausführen, die eine vorbestimmte Menge des Kupplungsproduktes des Haptens mit einem Enzym, eine vorbestimmte Menge einer Komponente des Reaktionssystems in unlöslicher Form und ein Substrat zur Bestimmung der Enzymaktivität besteht.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von einem Hapten oder einem entsprechenden Antikörper, dadurch gekennzeichnet, dass man einer Flüssigkeitsprobe, welche die zu bestimmende Verbindungen enthält, eine vorbestimmte, bekannte Menge des Kupplungsproduktes des Haptens mit einem Enzym und eine vorbestimmte, bekannte Menge des Haptens bzw. dessen Antikörpers in Form eines unlöslichen Präparates zusetzt, wobei eine Reaktion des Haptens mit dem Antikörper stattfindet, worauf die flüssige Phase von der festen Phase getrennt wird und die Enzymaktivität in einer dieser Phasen qualitativ bestimmt wird, welche Aktivität ein Mass für die Menge der zu bestimmenden Verbindung ist.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Hapten ein Vitamin oder Hormon ist.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine Oxidoreduktase als Enzym verwendet wird.

4. Testpackung zur Durchführung des Verfahrens nach Patentanspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt an

(a) einer vorbestimmten Menge des Kupplungsproduktes des Haptens mit einem Enzym,

(b) einer vorbestimmten Menge einer Komponente des Reaktionssystems in unlöslicher Form,

(c) einem Substrat zur Bestimmung der Aktivität des verwendeten Enzyms.

Zum Nachweis und zur Bestimmung niedermolekularer Substanzen, die in geringen Konzentrationen vorliegen, wie Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten, wurden Verfahren entwickelt, bei denen Proteine verwendet werden, die fähig sind, die nachzuweisende Substanz spezifisch zu binden. Diese Verfahren beruhen auf der Konkurrenz zwischen der nachzuweisenden Substanz in der Probe und einer bekannten Menge der gleichen Substanz, die radioaktiv markiert ist, mit einer begrenzten Menge des spezifischen bindenden Proteins. Durch die unbekannte Menge der bindungsfähigen Substanz wird bestimmt, welcher Anteil der radioaktiv markierten Substanz an das spezifische bindende Protein gebunden wird.

Es ist auch möglich, mit Hilfe dieser Verfahren, eine unbekannte Menge eines spezifischen bindenden Proteins durch Umsetzung einer Probe, die eine unbekannte Menge des spezifischen bindenden Proteins enthält, mit einer bestimmten Menge einer bindungsfähigen radioaktiv markierten Substanz zu bestimmen.

In der Literatur ist es üblich, diese Bestimmungsverfahren je nach der Art des verwendeten spezifischen bindenden Proteins zu unterscheiden, obwohl das grundlegende Prinzip all dieser Bestimmungen das gleiche ist. So wird z.B. von «konkurrierenden Protein-Bindungsversuchen» («competitive protein binding assays») gesprochen, wenn Rezeptor- oder Transportproteine verwendet werden, die im Körper vorkommen und von «radioimmunologischen Bestimmungen», wenn Antisubstanzen verwendet werden.

Für beide Arten von Bestimmungen sind radioaktiv markierte Substanzen erforderlich. Das Arbeiten mit diesen Substanzen erfordert das Vorhandensein präziser Messvorrichtungen, gut ausgerüstete Laboratorien und ein qualifiziertes Personal. Diese hohen Anforderungen machen eine allgemeine Anwendung dieser Bestimmungsverfahren besonders in kleinen Laboratorien unmöglich.

Es wurde nun ein Verfahren gefunden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von einem Hapten oder einem entsprechenden Antikörper. Haptene können als eine spezielle Gruppe niedermolekularer Verbindungen betrachtet werden.

Haptene und ihre Antikörper treten meist in geringen Konzentrationen auf. Nach der Definition von K. Landsteiner sind Haptene proteinfreie Substanzen, deren chemische Konfiguration so ist, dass sie nicht mit spezifischen Antikörpern reagieren können, jedoch auch nicht so, dass sie zur Bildung von Antikörpern führen können. Um jedoch trotzdem Antikörper zu Haptene bilden zu können, müssen die Haptene, bevor sie dem Testtier injiziert werden, an Polypeptide gekuppelt werden. Bei der Bestimmung einer niedermolekularen Verbindung konkurrieren die zu bestimmende Substanz und deren Kupplungsprodukt mit einem Enzym um eine bestimmte Menge des unlöslichen spezifisch bindenden Proteins. Je mehr der niedermolekularen Verbindung die Probe enthält, um so geringer ist die Chance für das Kupplungsprodukt aus dem löslichen Enzym und der Verbindung, sich mit dem unlöslichen spezifischen bindenden Protein zu verbinden und um so mehr des Kupplungsproduktes bleibt in der flüssigen Phase zurück, in der die Enzymaktivität auf einfache Weise gemessen werden kann.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man einer Flüssigkeitsprobe, welche die zu bestimmende Verbindungen enthält, eine vorbestimmte, bekannte Menge des Kupplungsproduktes des Haptens mit einem Enzym und eine vorbestimmte, bekannte Menge des Haptens bzw. dessen Antikörpers in Form eines unlöslichen Präparates zusetzt, wobei eine Reaktion des Haptens mit dem Antikörper stattfindet, worauf die flüssige Phase von der festen Phase getrennt wird und die Enzymaktivität in einer dieser Phasen qualitativ oder quantitativ bestimmt wird, welche Aktivität ein Mass für die Menge der zu bestimmenden Verbindung ist.

Bei der Bestimmung eines spezifischen bindenden Proteins mit den gleichen Reagenzien treten das zu bestimmende lösliche Protein und das unlösliche Protein in Konkurrenz, um eine bestimmte Menge des Kupplungsproduktes des Haptens mit dem Enzym zu binden. Wenn der Gehalt an spezifischem bindendem Protein in der Probe höher ist wird das unlösliche Protein weniger von dem Enzym-Kupplungsprodukt binden und folglich bleibt mehr Enzym in der flüssigen Phase zurück.

Ein spezifisches bindendes Protein mit zwei oder mehr bindenden Stellen kann ebenfalls nach dem erfundungsgemäßen Verfahren nachgewiesen und bestimmt werden, d.h. mit dem Enzym-Kupplungsprodukt und dem Haptenpräparat in unlöslicher Form. Die flüssige Phase des Reaktionsgemisches kann dann das Kupplungsprodukt an das spezifische bindende Protein gebunden enthalten und in der festen Phase kann der Komplex aus Enzym-Kupplungsprodukt und spezifischem bindendem Protein und dem in Wasser unlöslichen Haptenpräparat enthalten sein. Je mehr des zu bestimmenden Proteins in der Probe enthalten ist, umso mehr Enzymaktivität besitzt die flüssige Phase.

Mit Hilfe einer Bestimmungskurve für ein bestimmtes System, bei dem der zunehmende Gehalt an der zu bestimmenden Substanz gegen die gefundene Enzymaktivität, vorzugsweise in der flüssigen Phase, aufgetragen ist, kann die Menge der in der Probe enthaltenen zu bestimmenden Substanz für den gefundenen Wert für die Enzymaktivität abgelesen werden.

Das wichtigste Reagens für dieses Bestimmungsverfahren ist das Kupplungsprodukt aus dem Hapten und einem Enzym, im folgenden auch Enzym-Kupplungsprodukt genannt, das einerseits mit dem spezifischen bindenden Protein über die Haptenkomponente reagieren kann und andererseits Enzymaktivität besitzt. Dieses Reagens kann nach einem für ähnliche Produkte beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Das zweite Reagens, die unlösliche Komponente in dem Reaktionssystem dient zur Erleichterung der Trennung der verschiedenen enzymhaltigen Fraktionen des Reaktionsgemisches. Die Zugabe dieses Reagens führt zur Bildung einer festen Phase neben einer flüssigen Phase.

Die Enzymaktivität einer Fraktion des Reaktionsgemisches wird im allgemeinen gezeigt oder gemessen, indem diese Fraktion mit einem Substrat und anderen Substanzen zur Durchführung einer Enzymreaktion inkubiert wird. Vorzugsweise wird eine Reaktion angewandt, bei der eine gegärzte Verbindung gebildet oder entfernt wird, deren Absorption auch leicht quantitativ gemessen werden kann.

Niedermolekulare Substanzen, die nach dem neuen Verfahren nachgewiesen werden können und ein Molekulargewicht bis zu ungefähr 1500 besitzen, sind zum Beispiel Steroide, Vitamin B<sub>12</sub>, Folsäure, Thyroxin und Trijodothyronin, releasing factors, Histamin, Serotonin und andere biogene Amine, Digoxin, Digitoxin, Prostaglandine, Adrenalin, Nor-Adrenalin, pflanzliche Hormone, wie Auxin, Kinetin, Giberellinsäure und Antibiotika, wie Penicillin.

Das Verfahren zum Nachweis spezifischer bindender Proteine für niedermolekulare Substanzen kann angewandt werden, z.B. zur Bestimmung von Antigenen gegen Penicillin oder zur Bestimmung des Intrinsik-Faktors.

Die Herstellung von Kopplungsprodukten von Enzymen und Haptene kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden. Einige niedermolekulare Substanzen können schon Gruppen besitzen, die mit reaktionsfähigen Gruppen an der Oberfläche des Enzyms vernetzt werden können, während andere Substanzen erst derartige Gruppen durch chemische Reaktionen erhalten müssen. Es ist selbstverständlich, dass die ursprünglichen Bindungseigenschaften der niedermolekularen Verbindung und die Aktivität des Enzyms während dieses Verfahrens nicht wesentlich geändert werden können. Die Gruppen des Enzyms, die besonders geeignet sind für Kopplungsreaktionen sind Amino- und Carboxylgruppen. Wenn die modifizierte oder nicht-modifizierte niedermolekulare Substanz ebenfalls derartige Gruppen besitzt, kann die Kopplung z.B. durch Reaktionen, wie sie aus der Peptidsynthese bekannt sind, durchgeführt werden. Darüberhinaus können solche Substanzen, wie Glutaraldehyd, Difluordinitrodiphenylsulfon, Toluildiisocyanat, Di- und Trichlor-s-triazin für Kopplungsreaktion verwendet werden.

Spezielle Beispiele für die Kopplung von Haptene mit Proteinen sind z.B. in Methods in Immunology and Immunochimistry, Band 1, beschrieben. Die dort beschriebenen Verfahren werden angewandt zur Herstellung von Kopplungsprodukten zur Immunisierung sie können jedoch auch zur Herstellung von Kopplungsprodukten der Haptene und eines Enzyms angewandt werden, die für das erfundungsgemäße Verfahren wichtig sind.

Die Wahl des Enzyms, das eine Komponente für das Kopplungssystem (Hapten und Enzym) ist, hängt ab von Eigenschaften wie der spezifischen Aktivität (eine hohe Umwandlungsrate vergrößert die Empfindlichkeit des Testsystems) und der Einfachheit der Bestimmung des Enzyms. Die Bestimmung eines Enzyms, das eine Umwandlung katalysiert, bei der gefärbte Produkte entstehen oder verschwinden, ist einfach. Derartige colorimetrische Bestimmungen können auf einfache Weise automatisiert werden.

Es ist auch möglich, Enzyme zu verwenden, die Umwandlungen katalysieren, bei denen Komponenten auftreten oder verschwinden, die spektrophotometrisch oder fluorimetrisch bestimmt werden können. Diese Bestimmungen können ebenfalls automatisiert werden.

Für die Herstellung der Kopplungsprodukte werden Enzyme, wie Katalase, Peroxidase,  $\beta$ -Glukuronidase,  $\beta$ -D-Glukosidase,  $\beta$ -D-Galactosidase, Urease, Glukoseoxidase und Galactoseoxidase bevorzugt, besonders die Gruppe der Oxidoreduktasen.

Das unlösliche Haptenpräparat, das im erfundungsgemäßen Verfahren verwendet wird, kann auf bekannte Weise, z.B.

durch Vernetzung mit Chlorameisensäureäthylester, durch kovalente Bindung mit unlöslichen Trägern, wie Agarose, Vernetzung mit Dextran oder Filterpapier oder durch physikalische Kopplung an unlösliche Träger, wie Kunststoffe, hergestellt werden.

Die Form, in der die Reagenzien verwendet werden können, ist vielfältig. Die Komponente des Reaktionssystems, die mit einem Enzym gekoppelt ist, kann gefriergetrocknet oder in einem Puffer gelöst sein. Darüber hinaus kann ein fester Träger, z.B. ein Papierstreifen, der mit dem Kopplungsprodukt imprägniert ist, verwendet werden.

Das unlösliche Präparat kann in Form von Teilchen verschiedener Form, wie Körper, Kugeln und Stäbchen oder in Form eines Streifens des einen oder anderen Trägermaterials gebracht werden.

Zur Durchführung des erfundungsgemäßen Verfahrens wird vorzugsweise eine Testpackung verwendet, die gekennzeichnet ist durch einen Gehalt an

- 20 (a) einer vorbestimmten Menge des Kopplungsproduktes des Haptens mit einem Enzym;
- (b) einer vorbestimmten Menge einer der Komponenten des Reaktionssystems in unlöslicher Form;
- (c) einem Substrat zur Bestimmung der Aktivität des verwendeten Enzyms.

Wenn erwünscht, kann die Testpackung auch die notwendigen Hilfsmittel zur Herstellung einer Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe für eine quantitative Bestimmung, wie Reagenzgläser, Pipetten und Kolben mit Verdünnungsmittel, 10 enthalten.

### Beispiel 1

#### Bestimmung von Testosteron

##### A) Herstellung von Testosteron-3-HRP

100 mg Testosteron-3-(O-carboxymethyl)-oxim und 0,143 ml Tri-n-butylamin wurden in 5 ml Dioxan gelöst. Die Lösung wurde auf 2° C abgekühlt und dann wurden 0,03 ml Isobutylchlorcarbonat zugegeben. Nach 30 min wurde die Lösung zu 100 mg HRP(Meerrettichperoxidase) in einem Gemisch von 9 ml Wasser und 6 ml Dioxan zugegeben und mit 0,1 n NaOH auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Diese Lösung wurde 4 h bei 2° C gerührt und über Nacht dialysiert. Der Niederschlag, der nach Einstellung des Dialysats auf einen pH-Wert von 4,6 erhalten worden war, wurde, nachdem er über Nacht stehengelassen worden war, zentrifugiert, in 10 ml Wasser suspendiert und mit Hilfe von Natronlauge gelöst. Das Material wurde dreimal mit 15 ml Aceton bei einem pH-Wert von 4,5 ausgefällt, in 15 ml Wasser, das mit Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt war, gelöst, dialysiert und schliesslich lyophilisiert.

##### B) Herstellung von Testosteron-3-BSA

Dieses Kopplungsprodukt wurde auf die gleiche Weise wie das Testosteron-3-HRP hergestellt, wobei jedoch als Ausgangsmaterial 50 mg Testosteron-3-(O-carboxymethyl)-oxim und 150 mg BSA(Rinderserumalbumin) verwendet wurden.

##### C) Herstellung von Antikörpern gegen Testosteron-3-BSA

5 Kaninchen wurden intramuskulär zunehmende Dosen von 60 Testosteron-3-BSA in vollständigem Freund'schen Adjuvans (0,5, 1 und 2 mg) in Intervallen von 3 Wochen injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden den Tieren intravenös 2 mg Antigen in physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Eine Woche danach wurde den Tieren Blut abgenommen. Die gegen BSA gebildeten Antikörper wurden entfernt, indem das Serum anteilweise mit BSA-m-aminobenzoyloxymethylcellulose, die nach dem Verfahren von Gurvich (siehe D) hergestellt worden war, behandelt wurde.

#### D) Herstellung von Antitestosteroncellulose

Diese Substanz wurde entsprechend dem von Gurvich in Biokhimiya 26, 934 (1961) beschriebenen Verfahren hergestellt.

##### 1. Herstellung von «Aminocellulose»:

50 g Whatman Cellulose, die mehrfach gewaschen und dekantiert worden war, wurden in 100 ml einer 0,7-prozentigen Natriumacetatlösung suspendiert, die 2 g N(m-Nitrobenzoxy)-methyl-pyridin enthielt. Das Gemisch wurde bei 60 bis 80° C getrocknet und 40 min auf 125° C erhitzt! Das entstehende Produkt wurde gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen, bei 80° C getrocknet, mit Benzol gewaschen und erneut getrocknet. 50 g des getrockneten Produktes wurden durch Suspension in 300 ml einer 15-prozentigen  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung reduziert und 30 min bei 50 bis 60° C gerührt. Das Produkt wurde filtriert und nacheinander mit destilliertem Wasser, 30-prozentiger Essigsäure und wieder mit destilliertem Wasser gewaschen.

##### 2. Behandlung mit ammoniakalischer Kupferlösung:

40 ml 10-prozentiger Schwefelsäure, 20 ml 50-prozentiger Salpetersäure und 140 ml destilliertes Wasser wurden unter Röhren auf 90° C erhitzt. Anschliessend wurden 5,9 g CuO in kleinen Anteilen zugegeben. Die Lösung wurde 2 h zum Sieden erhitzt und mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. 80 ml dieser Lösung wurden in ein Eisbad gegeben und unter Röhren zu 160 ml kalter 4 n NaOH zugegeben. Nach 30-minütigem Röhren wurde der Niederschlag zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in 80 ml 25-prozentigem Ammoniak gelöst. Zu dieser Lösung wurde nach und nach 1 g «Aminocellulose» zugegeben. Das Gemisch wurde 1½ h gerührt und anschliessend wurden 40 ml siedendes Wasser zugegeben und die Lösung schnell auf 0° C abgekühlt. Die Lösung wurde mit 10-prozentiger Schwefelsäure neutralisiert, worauf die Aminocellulose ausflockte. Sie wurde mit kaltem destillierten Wasser gewaschen.

##### 3. Herstellung von $\gamma$ -Globulin:

Zu Kaninchen Antitestosteronserum wurden 180 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pro ml Serum zugegeben. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und der entstehende Niederschlag zentrifugiert, zweimal mit einer 18-prozentigen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung gewaschen und in so viel 0,05 m Natriumborat mit einem pH-Wert von 8,6 aufgenommen, dass die Proteinkonzentration ungefähr 10 mg/ml betrug.

##### 4. Bindung des $\gamma$ -Globulins an Aminocellulose:

350 mg «Aminocellulose» wurden in 50 ml destilliertem Wasser suspendiert. Die Suspension wurde auf 0° C abgekühlt. 10 ml 36-prozentige Salzsäure wurden zugegeben und anschliessend 10 ml 10-prozentige  $\text{NaNO}_2$ -Lösung zugetropft. Die Suspension wurde zentrifugiert, mit kaltem destillierten Wasser und anschliessend mit 0,05 m Natriumborat mit einem pH-Wert von 8,6 gewaschen. Die Cellulose wurde in 43 ml 0,05 m Natriumborat mit einem pH-Wert von 8,6 suspendiert. Zu dieser Suspension wurden 7 ml der wie oben hergestellten  $\gamma$ -Globulinlösung zugegeben. Das Gemisch wurde 26 h bei 4° C gerührt, zentrifugiert und mit 0,02 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 gewaschen. Von dem Antiserum jedes der 5 immunisierten Kaninchen wurde eine Cellulosesuspension hergestellt (A bis E).

#### E) Bestimmung von Testosteron mit Hilfe von Testosteron-3-HRP und Antitestosteroncellulose

##### I) Immunreaktion

0,5 ml einer Probe, enthaltend Testosteron, 0,2 ml Testosteron-3-HRP (100 mg/ml) und 0,3 ml einer Antitestosteroncellulose-Suspension wurden 2 h bei Raumtemperatur rotiert und dann 5 min mit 1000 g zentrifugiert.

Die Immunreaktion fand in 0,02 m Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,0, enthaltend 2% Schafserum, statt.

##### II) Enzymreaktion

0,5 ml der überstehenden Flüssigkeit wurden bei Raumtemperatur mit 1,5 ml Substrat 30 min inkubiert. Die Extinktion wurde bei 460 nm gemessen.

Das Enzymsubstrat enthielt 10  $\mu\text{l}$ , 30-prozentiges Wasserstoffperoxid und 20 mg 5-Aminosalicylsäure in 150 ml 0,02 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,2.

Die Fig. 1 zeigt Messwerte, bei denen Testosteron-3-HRP an die Antitestosteroncellulose-Zubereitungen gebunden worden ist. In diesem Falle wurde nur Puffer als Probe in dem Testsystem zugegeben. Wenn Cellulose anstelle von Antitestosteroncellulose zugegeben wird, bleiben mehr als 95 % der Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit enthalten. Die Zubereitungen B, D und E zeigten, dass fast kein Testosteron-3-HRP gebunden worden war, jedoch bei den Zubereitungen A und C.

Fig. 2 zeigt die Ergebnisse der Inkubation einer Testosteronverdünnungsreihe mit Testosteron-3-HRP bei vier verschiedenen Konzentrationen von Antitestosteroncellulose C.

1 mg/ml (I), 2 mg/ml (II), 4 mg/ml (III) und 16 mg/ml (IV). Es ist offensichtlich, dass mit diesem System eine Menge von ungefähr 10 ng Testosteron gezeigt werden kann.

#### Beispiel 2

##### Bestimmung von Östradiol

A) Östradiol-17-succinyl-HRP wurde hergestellt durch die in Beispiel 1 A) beschriebene gemischte Anhydrid-Methode, wobei 50 mg Östradiol-17-hemisuccinat und 50 mg HRP als Ausgangsmaterialien verwendet wurden.

B) Östradiol-17-succinyl-BSA wurde nach der in Beispiel 1 A) beschriebenen gemischten Anhydrid-Methode hergestellt, wobei 100 mg Östradiol-17-hemisuccinat und 150 mg BSA als Ausgangsmaterialien verwendet wurden.

C) Zur Herstellung der Antikörper gegen Östradiol-17-succinyl-BSA wurden 5 Kaninchen nach dem in Beispiel 1 C) beschriebenen Schema immunisiert. Die Sera wurden mit BSA-m-Aminobenzoyloxymethylcellulose absorbiert.

D) Antiöstradiolcellulose wurde auf die in Beispiel 1 D) für Antitestosteroncellulose beschriebene Weise hergestellt. Von jedem der immunisierten Kaninchen wurde eine Cellulose-Zubereitung hergestellt, die mit 16 bis einschliesslich 20 numeniert wurden.

E) Die Untersuchung wurde analog derjenigen für Testosteron in Beispiel 1 E) durchgeführt.

Die Fig. 3 und 4 zeigen einige Ergebnisse. Die Fig. 3 zeigt, dass drei verwendbare Antisera durch die Immunisierung erhalten wurden, von denen 17 den höchsten Titel besitzt. Die Fig. 4 zeigt das Testsystem, bei dem Antiöstradiolcellulose 17 in einer Konzentration von 8 mg/ml verwendet wurde. Das System unterscheidet nicht zwischen Östron und 17a-Östradiol. 17a-Östradiol, besonders Östriol, zeigen eine geringere Kreuzreaktion. Testosteron und Progesteron beeinflussen das System nur in sehr hohen Konzentrationen

#### Beispiel 3

##### Bestimmung von Antikörpern gegen Penicillin Penicilloyl-Katalase

30 mg Benzylpenicillinsäure wurden in 5 ml 96-prozentigem Äthanol gelöst und zu 200 mg Katalase in 45 ml 0,1 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5 zugetropft. Die Reaktion wurde 2 h fortgesetzt, wobei der pH-Wert mit 0,5 n NaOH zwischen 7,2 und 8,2 gehalten wurde. Das Reaktionsgemisch wurde gegen  $6 \times 3$  10,02 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0 dialysiert.

Auf die gleiche Weise wurden 250 mg Benzylpenicillinsäure an 5 g m-Aminobenzoyloxymethylcellulose, die nach dem Verfahren von Gurvich (Biokhimiya 26, 934 (1961)) hergestellt worden war, gekoppelt. Das Kopplungsprodukt wurde jedoch

nicht dialysiert, sondern auf einem Glasfilter gewaschen.

Eine Überempfindlichkeit von Menschen gegenüber Penicillin konnte auf folgende Weise gezeigt werden:

0,2 ml einer Probe von nicht-hämolyisiertem Serum wurden mit 0,5 ml einer Lösung von Penicillol-Katalase (1:800) vermischt. Nach 30 min wurden 10 mg Penicilloyl-m-amino-benzoyloxymethylcellulose zugegeben. Das Gemisch wurde 30 min rotiert und anschliessend die Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit bestimmt, indem 0,02 ml dieser Flüssigkeit zu 2,8 ml 0,05 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,8 zugegeben wurden, der 1,2 µl 30-prozentiges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthielt und anschliessend die Abnahme der Extinktion bei 240 nm gemessen wurde. Im Serum von Patienten, die gegenüber Penicillin überempfindlich waren, wurde eine geringere Enzymaktivität in der Flüssigkeit gefunden als bei Kaninchenserum. Die Werte für Menschen, die nicht überempfindlich waren, wichen nicht wesentlich von denjenigen mit Kaninchenserum ab.

#### Beispiel 4

##### Bestimmung von Folinsäure

###### A) Herstellung von Folatglukoseoxidase

200 mg Glukoseoxidase (140 IU/mg) wurden in 10 mg PBS (mit Phosphat gepufferte Salzlösung, eine phosphathaltige physiologische Kochsalzlösung) mit einem pH-Wert von 7,0 gelöst. 30 mg 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid (MCDI) wurden zugegeben und anschliessend 24 mg Folinsäure. Die Reaktion dauerte 2 h und anschliessend wurde eine sorgfältige Dialyse gegen PBS mit einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt.

B) Herstellung von Folat-MBSA(methyliertes Rinderserumalbumin)

Folat-MBSA wurde hergestellt nach dem von Ricker und Stollar beschriebenen Verfahren (Biochemistry 6, 2001 (1967)). 25 mg MCDI wurden zu 50 mg BSA in 50 ml Wasser zugegeben und anschliessend 20 mg Folinsäure. 2 h später hatte sich ein gelber Niederschlag gebildet. Schliesslich wurde das ganze Reaktionsgemisch eine beträchtliche Zeit gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert.

C) Herstellung von Antiserum gegen Folat-MBSA

Am Tage 0, 21 und 42 wurden jeweils 4 Kaninchen intramuskulär 2 mg Folat-MBSA in vollständigem Freund'schen Adjuvans und am Tage 35 intravenös 3 mg Folant-MBSA in physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Am Tage 49 wurde den Tieren Blut abgenommen.

D) Antifolatcellulose wurde entsprechend dem in Beispiel 1 D) beschriebenen Verfahren hergestellt.

E) Bestimmung von Folinsäure

100 µl der zu untersuchenden Probe und 700 µl einer Antifolatcellulose-Suspension wurden 3 h rotiert. 200 µl Folatglukoseoxidase (1:1500) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde nochmals 3 h rotiert und zentrifugiert und anschliessend die Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit bestimmt. Diese Bestimmung wurde durchgeführt durch Vermischen von 0,5 ml der überstehenden Flüssigkeit mit einer Lösung von 50 mg Glulose, 10 µg HRP und 1 mg 5-Aminosalicylsäure in 2,5 ml 0,05 n Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 und Messung der Extinktion nach 30 min bei 460 nm.

Fig. 5 zeigt den Prozentsatz des gebundenen Enzyms gegen die Konzentration der Antifolatcellulose.

Fig. 6 zeigt die Empfindlichkeit des Testsystems in einer Antifolatcellulose-Konzentration von 2 mg/ml und die Wirkung von Glycin, Asparagin, Alanin, und Glutaminsäure.

#### Beispiel 5

##### Bestimmung von Digoxin

###### A) Herstellung von Digoxin-HRP

Zu 22 mg Digoxin, in 1 ml abs. Äthanol suspendiert, wurde unter Röhren 1 ml 0,1 m Natriummetaperjodat zugetropft. Nach 25 min wurden 0,3 ml 0,1 m Äthylenglykol zugegeben. 5

min später wurde dieses Gemisch unter Röhren zu einer Lösung von 32 mg Meerrettichperoxidase (HRP) in 1 ml destilliertem Wasser zugetropft, das mit 5-prozentiger K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt war. Während der Reaktion wurde der pH-Wert durch Zugabe 5-prozentiger K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf 9 bis 9,5 gehalten. Als der pH-Wert stabil war, wurden 15 mg NaBH<sub>4</sub> in 1 ml destilliertem Wasser zugegeben. Nach 3 h wurde der pH-Wert mit 1 m Ameisensäure auf 6,5 eingestellt. 1 h später wurde 1 m NH<sub>4</sub>OH zugegeben, bis ein pH-Wert von 8,5 erreicht war. Das Gemisch wurde über Nacht gegen kaltes fliessendes Wasser dialysiert. Schliesslich wurde der pH-Wert mit 0,1 n Salzsäure auf 4,5 eingestellt. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur und 4 h bei 4°C stehengelassen, um einen Niederschlag zu erhalten, der 1 h bei 1000 g zentrifugiert wurde. Der Niederschlag wurde in 5 ml 0,1 m NaHCO<sub>3</sub> gelöst, gründlich dialysiert und gefriergetrocknet.

###### B) Herstellung von Digoxin-BSA

Digoxin-Rinderserumalbumin (BSA) wurde auf die gleiche Weise, wie sie oben für Digoxin-HRP angegeben ist, hergestellt, wobei jedoch von 436 mg Digoxin und 560 mg BSA ausgegangen wurde und die Mengen der anderen Reagenzien in gleichem Verhältnis erhöht wurden wie das Dioxin.

###### C) Herstellung von Antikörpern gegen Digoxin

5 Kaninchen wurden 400, 800 bzw. 1600 µg Dioxin-BSA im Abstand von 14 Tagen injiziert. Das Immunogen wurde mit vollständigem Freund'schen Adjuvans vermischt und intramuskulär verabreicht. 14 Tage nach der letzten Injektion wurde den Tieren intravenös 800 µg Digoxin-BSA in physiologischer Kochsalzlösung injiziert. 10 Tage später wurde den Tieren das Blut entnommen. Das Serum wurde mit BSA-m-Aminbenzylbenzoyloxymethylcellulose adsorbiert.

###### D) Herstellung von Antidigoxincellulose

Antidigoxincellulose wurde nach dem Gurvich-Verfahren, wie unter 1 D) beschrieben, hergestellt.

###### E) Bestimmung von Digoxin

Eine Verdünnungsreihe wurde mit Digoxin in 0,1 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5 hergestellt, enthaltend 0,9 % NaCl, 0,5 % Tween-20 und 1,0 % BSA. Die Verdünnungsreihe ging von 0,1 bis 100 ng/ml. 1 ml einer Digoxin-Lösung wurde mit 0,1 ml Digoxin-HRP in einer geeigneten Verdünnung vermischt und anschliessend wurden 2 mg Antidigoxincellulose, die in 0,4 ml Puffer suspendiert war, zugegeben. Das Gemisch wurde 6 h bei Raumtemperatur rotiert und anschliessend zentrifugiert und die Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit bestimmt.

Zugabe von 0,8 ng Digoxin führte zu einer messbaren Zunahme der Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit. Digoxin allein zeigte eine geringe Kreuzreaktion in dem System während Cholesterin, Cortisol, Östradiol, Testosteron und Progesteron keine Kreuzreaktion in dem System zeigten.

#### Beispiel 6

##### Bestimmung von Cortisol

###### A) Herstellung von Cortisol-21-galactose-oxidase

50 mg Cortisol-21-hemisuccinat und 100 mg Galactoseoxidase wurden nach dem in Beispiel 1 A) beschriebenen gemischten Anhydridverfahren hergestellt.

###### B) Herstellung von unlöslichem Transcortin

100 mg Transcortin, das durch Chromatographie mit DEAE, Cellulose bzw. Hydroxylapatit gereinigt worden war, wurden folgendermassen mit Hilfe des CNBr-Verfahrens an 3 g Sepharose 4 B gekoppelt: 3 g Sepharose 4 B-Suspension wurden aktiviert durch Vermischen mit 4 ml einer 2,5-prozentigen (Gew./Vol.) CNBr-Lösung in destilliertem Wasser und anschliessend wurde der pH-Wert mit 1 n NaOH auf 10 bis 11 eingestellt und 6 min auf diesem Wert gehalten. Die Sepharose wurde mit Eiswasser und 0,1 m NaHCO<sub>3</sub> gewaschen. Dann

wurden 100 mg Transcortin in 20 ml 0,1 m NaHCO<sub>3</sub> zugegeben und die Suspension 24 h bei 4° C geschüttelt. Dann wurde nacheinander mit 0,5 m NaHCO<sub>3</sub>, 0,05 m Citratpuffer mit einem pH-Wert von 1,1 und 0,05 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6 gewaschen und die Sepharose in dem letzten Puffer gelassen, zu dem 0,1 % Merthiolat zugegeben worden war.

C) Bestimmung von Cortisol

0,5 ml einer cortisolhaltigen Probe (Standard, Plasma oder Urin) wurden zweimal mit Methylchlorid extrahiert (2×3 ml). Die vereinigten Auszüge wurden zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und mit 0,2 ml Cortisol-21-galactose-oxidase in einer geeigneten Konzentration und 0,3 ml Transcortin-Sepharose-Suspension (5 mg/ml) vermischt. Das Gemisch wurde 15 min bei 4° C rotiert und zentrifugiert. Anschliessend wurde die Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit durch Zugabe von 0,5 ml dieser Flüssigkeit zu 1,5 ml eines Substrats bestimmt. Das Substrat bestand aus 100 mg D-Galactose, 20 mg 5-Amino-salicylsäure und 10 µg Peroxidase in 150 ml 0,02 m Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0. 30 min später wurde die Extinktion bei 460 nm gemessen.

5 ng/ml Cortisol in der Probe führten zu einer messbaren Zunahme der Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit. Corticosteron und Progesteron beeinflussen das System nur, wenn grössere Mengen zugegeben wurden. Testosteron und Aldosteron besass kaum einen Einfluss.

*Beispiel 7*

*Bestimmung von Transcortin*

Die zur Bestimmung von Cortisol, wie in Beispiel 6 beschrieben, verwendeten Reagentien wurden ebenso zur Bestimmung von Transcortin verwendet.

Von einer Verdünnungsreihe von Transcortin von 0 bis 1280 ng/ml wurden 0,5 ml 15 min bei 4° C mit 0,2 ml Cortisol-21-galactose-oxidase in einer entsprechenden Verdünnung inkubiert. Zu dieser Verdünnungsreihe wurden 0,3 ml Transcortin-Sepharose (15 mg/ml) zugegeben und das Gemisch 15 min bei 4° C rotiert. Die Aktivität der überstehenden Flüssigkeit wurde, wie in Beispiel 6 beschrieben, gemessen.

Eine Probe, enthaltend 40 ng/ml Transcortin, zeigte eine messbare Zunahme der Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit, während sich bei Gegenwart von 320 ng/ml die gesamte Enzymaktivität in der überstehenden Flüssigkeit fand.





