



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 286 876 A5

Ertëilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

4(51) G 01 N 33/577

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD G 01 N / 331 650 1 (22) 10.08.89 (44) 07.02.91

(71) siehe (73)

(72) Schütt, Christine, Prof. Dr. sc. med.; Grunwald, Uwe, DE

(73) Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Domstraße 11, O - 2200 Greifswald, DE

(74) Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Direktorat für Forschung/BFSN, Rudolf-Petershagen-Allee, O - 2200 Greifswald, DE

(54) Verfahren zur Bestimmung eines löslichen humanen Monozytenoberflächenantigens

(55) Enzymimmunoassay; lösliches Monozyt antigen, human; monoklonaler Antikörper, markiert; Fängerantikörper; Immundiagnostik

(57) Die Erfindung betrifft eine Bestimmungsmethode zum schnellen und zuverlässigen Nachweis eines löslichen humanen Monozytenoberflächenantigens, vorzugsweise des Glykoproteins CD 14, in Körperflüssigkeiten. Die quantitative Bestimmung des CD 14 erfolgt unter Verwendung des CD 14-spezifischen monoklonalen Antikörpers RoMo 1, der mit einem Enzym direkt markiert ist. Es kommt ein Zwei-Seiten-Bindungstest (Enzymimmunoassay) zur Anwendung, in dem als Fängerantikörper polyklonale Anti-CD 14-Antisera oder andere CD 14-spezifische monoklonale Antikörper eingesetzt werden, wenn diese eine andere Epitop-Spezifität als RoMo 1 besitzen. Anwendungsgebiete sind die Immunologie und Immundiagnostik.

Patentanspruch:

Verfahren zur Bestimmung eines löslichen humanen Monozytenoberflächenantigens, vorzugsweise des Serumproteins CD 14, in Körperflüssigkeiten, **dadurch gekennzeichnet**, daß als spezifischer Nachweisantikörper der monoklonale Antikörper RoMo 1, welcher direkt markiert ist, in einem Zwei-Seiten-Bindungs-Enzymimmunoassay und als Fängerantikörper an der festen Phase des EIA-Kits polyklonale Anti-CD 14-Antiseren oder andere CD 14-spezifische monoklonale Antikörper, welche eine andere Epitop-Spezifität als der monoklonale Antikörper RoMo 1 besitzen, in einem Zwei-Seiten-Bindungs-Enzymimmunoassay eingesetzt sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Methode zur schnellen und zuverlässigen Bestimmung eines löslichen Monozytenoberflächenantigens in menschlichen Körperflüssigkeiten und findet bei Immuntests in der Immunologie und Immundiagnostik Anwendung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Allgemein ist bekannt, daß sich immunologische Verfahren zum Nachweis von Proteinen an und in menschlichen Zellen und Körperflüssigkeiten mittels monoklonaler Antikörper als sehr zuverlässig erweisen. Für den spezifischen Nachweis der Antigene kommen in vielen Anwendungsfällen diese monoklonalen Antikörper bei Enzymimmunoassays zum Einsatz. Für die Bestimmung des Monozytenoberflächenantigens CD 14 sind verschiedene monoklonale Antikörper beschrieben. So werden durch Todd et al. in: Bernard et al. (ed.), Leukocyte Typing, Springer Verlag, New York, 1984, S. 424, der monoklonale Antikörper Leu M3, durch Bazil et al. in: Eur. J. Immunol. 16, 1984, S. 1563, der monoklonale Antikörper MEM 18 und durch Goyet et al. in: McMichael et al. (ed.), Leukocyte Typing III, Springer Verlag, New York, 1987, S. 613, der monoklonale Antikörper My4 für die Bestimmung von Monozyten in Zellsuspensionen genannt, da CD 14 ein monozytenspezifisches Antigen ist, das auf anderen Zellen nicht exprimiert wird. Aus der Literatur ist jedoch nicht zu entnehmen, daß sich diese monoklonalen Antikörper auch für den Nachweis des löslichen Monozytenoberflächenantigens CD 14 eignen bzw. dessen Nachweis beschrieben wurde.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist ein kostengünstiges und zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung des löslichen Monozytenoberflächenantigens CD 14 in menschlichen Körperflüssigkeiten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht in einem Verfahren zur quantitativen Bestimmung des löslichen menschlichen Monozytenoberflächenantigens CD 14 in Körperflüssigkeiten unter Verwendung eines geeigneten monoklonalen Antikörpers, der keine Kreuzreaktivität zu anderen Serumproteinen zeigt. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zur Bestimmung des löslichen Monozytenoberflächenantigens CD 14 in Körperflüssigkeiten der monoklonale Antikörper RoMo 1, welcher direkt markiert ist, als spezifischer Nachweisantikörper in einem Zwei-Seiten-Bindungs-Enzymimmunoassay dient, wobei als Fängerantikörper an der festen Phase des EIA-Kits polyklonale Anti-CD 14-Antiseren oder andere CD 14-spezifische monoklonale Antikörper, die eine andere Epitop-Spezifität als der monoklonale RoMo 1 besitzen, verwendet werden. Der monoklonale Antikörper RoMo 1 ist in seiner Herstellung durch das DD-WP 255543 beschrieben. Als Fängerantikörper eignet sich der CD 14-spezifische monoklonale Antikörper MEM 18. Der spezifische monoklonale Antikörper RoMo 1 ist vorteilhafterweise mit dem Enzym Peroxidase direkt markiert. RoMo 1 besitzt eine hohe Affinität zu einem Epitop auf CD 14, einem 53kDa-Glykoprotein. Dadurch ist gesichert, daß die Verwendung des monoklonalen Antikörpers RoMo 1 stets zu einem eindeutigen Nachweis des humanen Monozytenmembranantigens in löslicher Form führt.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden. Dabei sind folgende Verfahrensschritte vorgesehen.

1. Feste Phase: Benetzung mit monoklonalem Antikörper MEM 18 (10 µg/ml) in 0,1 M Carbonatpuffer, pH 9,5, ca. 12–15 h bei Raumtemperatur
danach zweimal waschen mit PBS plus 0,1% Tween 20
2. Antigen (CD 14)haltige Probe verdünnen in PBS plus 0,1% Tween 20,
Inkubation ca. 12–15 h bei 4 Grad Celsius, danach zweimal waschen mit PBS plus 0,1% Tween 20
3. Konjugat: monoklonaler Antikörper, mit POD direkt markiert,
verdünnen in PBS, 0,1% Tween 20, 5% Kälberserum, Inkubation ca. 2 h bei 4 Grad Celsius, danach zweimal waschen mit PBS plus 0,1% Tween 20

4. Reaktion des gebundenen POD mit chromogenem Substrat o-Phenylendiamin (0,5 µg/ml) in 0,1 M Citratpuffer, pH 5,0,
 Zugabe von 5 µl 30%igem H₂O₂
 Reaktionsdauer 5 min
 Reaktionsstop mit 1 M H₂SO₄

Dadurch ist es möglich, die untere Nachweisgrenze von 20 ng/ml zu garantieren. Als Standard wird affinitätschromatographisch gereinigtes Antigen CD 14 verwendet.

Anstelle des Fängerantikörpers MEM 18 sind andere Antikörper, z.B. polyklonale Antiseren gegen das Antigen CD 14 von Kaninchen oder andere monoklonale Antikörper gegen CD 14 einsetzbar.

Anstelle des POD-markierten RoMo 1 ist ein biotinylierter RoMo 1 einsetzbar. Die Nachweisstrecke besteht dabei aus Avidin-POD-Konjugat und gleichem Substrat.

Tabelle

Gehalt an löslichem CD 14

	normal	pathologisch
Serum	3-6 µg/ml	↑↓
Urin	-	↑
Liquor	-	↑
Amnionflüssigkeit	-	↑
Gelenkflüssigkeit	+	↑↓