



DEUTSCHES PATENTAMT

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(44) Veröff.-tag der DD-Patentschrift:	(45) Veröff.-tag der Aufrechterhaltung:
DD G 01 N / 324 882 7	29. 04. 88	29. 08. 90	24. 08. 95

(30) Unionspriorität:

(72) Erfinder:	Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med., 10179 Berlin, DE; Porstmann, Bärbel, Doz. Prof. Dr. sc. med., 10179 Berlin, DE; von Baehr, Rüdiger, Prof. Dr. sc. med., 10315 Berlin, DE; Nugel, Elsa, 10969 Berlin, DE
(73) Patentinhaber:	Medizinische Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin, Schumannstr. 20/21, 10117 Berlin, DE
(74) Vertreter:	Wehlan, Helmut, Dr., Pat.-Anw., 10247 Berlin

(54) Festphasenimmunoassay zum Nachweis viraler Infektionen

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
nichts ermittelt

Patentansprüche:

1. Festphasenimmunoassay zum Nachweis viraler Infektionen, **dadurch gekennzeichnet**, daß er koimmobilisierte Antikörper zur Bindung nachzuweisenden Antigens und Antigene sowie Antigene zur Bindung spezifischer Antikörper enthält, mit denen verschiedene Antigene und/oder spezifische Antikörper in einem Ansatz
 - a) direkt als Antigen
 - b) indirekt über induzierte Antikörpersimultan erfaßt werden.
2. Festphasenimmunoassay nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß er Antigen sowie Antigene zur Bindung spezifischer Antikörper, die an Antikörper kovalent zu antigenstrukturtragenden Antikörpern gebunden sind, enthält.
3. Festphasenimmunoassay nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß er antigenstrukturtragende Antikörper, die wahlweise immobilisiert oder markiert sind, enthält.
4. Festphasenimmunoassay nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß er bei vorhandenem Erregerantigen oder/und Antikörper gegen ein Antigen eines anderen Erregers entweder markierten gebundenen Antikörper oder markiertes gebundenes Antigen und bei Doppelfunktion beide parallel gebunden enthält.
5. Festphasenimmunoassay nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß er Peptid sowie unterschiedliche Peptide, die kovalent an Antikörper gebunden sind, enthält.
6. Festphasenimmunoassay nach Anspruch 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Peptide Proteinsequenzen von Erregern sind.
7. Festphasenimmunoassay nach Anspruch 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Peptide Proteinsequenzen des HIV-1 und HIV-2 sind.

Hierzu 5 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft einen Festphasenimmunoassay zur Erkennung viraler Infektionen. Sie dient dem kombinierten Nachweis mehrerer Infektionserreger, wobei man sich der Diagnostik zirkulierenden Antigens und zirkulierender Antikörper bedient. Sie kann auf dem Gebiet der Humanmedizin, in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, in der mikrobiologisch-virologischen und der klinisch-immunologischen Diagnostik eingesetzt werden. Ferner findet sie Anwendung in Hygieneeinrichtungen zur Aufklärung epidemiologischer Situationen hinsichtlich der Verbreitung der nachzuweisenden Erreger sowie in Blutspendezentralen und der Pharmaindustrie bei der Elimination erregerrhaltiger biologischer Flüssigkeiten oder Organe.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Festphasenimmunoassaytechniken sind die am häufigsten angewendeten Methoden zum Nachweis infektiöser Erreger (Bakterien, Viren). Da die Infektion mit einem Erreger in dem befallenen Organismus die Erzeugung spezifischer Antikörper hervorruft, wird deren Nachweis als indirekter Beweis eines stattgefundenen Kontaktes mit dem entsprechenden Erreger gewertet und überall dort angewendet, wo sich virales oder bakterielles Antigen aufgrund sehr geringer Konzentration in dem Untersuchungsgut nicht sicher nachweisen lassen. Kommen letztere in den für die Nachweistechiken ausreichenden Konzentrationen vor, wird ihrem Nachweis als direkter Beweis für die Infektion der Vorzug gegeben (Literaturübersicht bei Porstmann, T. und G. Porstmann, Dt. Gesundheitswesen **36**, 1986–1990 [1981]). Damit werden Antikörper- und Antigennachweis als Immunoassayvarianten **nebeneinander** in verschiedenen Testen praktiziert. Die ständige Zunahme der sich als pathogen herausstellenden Infektionserreger führt zu einer steigenden Zahl unterschiedlicher Tests bei der Diagnostik, vor allem aber bei der Überwachung der für die Therapie vorgesehenen biologischen Produkte. Bisher wurde für den Nachweis eines Erregers mindestens ein Test benötigt. Dabei bedient man sich beim Antigentest bekannter Verfahren wie des kompetitiven Festphasenimmunoassays mit insolubilisiertem Antigen oder Antikörper sowie des Zwei-Seiten-Bindungstestes (Schuurs, A. H. W. M. und B. K. van Weemen: Clin. Chim. Acta **81**, 1–40 [1977]). Für den Nachweis spezifischer Antikörper sind vier verschiedene Verfahren – Antiglobulin- oder Sandwichtechnik, Kompetitionstechnik, Capturetechnik und Brückentechnik – beschrieben worden (R. Tedder: in J. C. Gluckman und E. Vilmer (Hrsg.): Acquired Immuno Deficiency Syndrome; Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, Paris, 1986, S. 173–181).

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, Antigen bakterieller oder viraler Infektionserreger sowie spezifische Antikörper gegen andere Infektionserreger in ein und demselben Ansatz nachzuweisen und damit die Zahl der Testansätze gegenüber der Anwendung bei bisherigen Testverfahren zu reduzieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Festphasenimmunoassay zum simultanen Nachweis von Antigen und spezifischen Antikörpern zu entwickeln. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß Antikörper zur Bindung nachzuweisenden Antigens und Antigen zur Bindung spezifischer Antikörper koimmobilisiert werden bzw. daß Antigen an den Antikörper vor seiner Immobilisierung kovalent gebunden wird. Bei vorhandenem Erregerantigen oder/und Antikörper gegen ein Antigen eines anderen Erregers bindet sich entweder ein markierter Antikörper oder ein markiertes Antigen; bei Doppelinfektionen binden sich beide parallel. Durch Kovalentbindung unterschiedlicher Peptide sowie durch deren Koimmobilisierung und Markierung lassen sich spezifische Antikörper gegen mehr als einen Erreger gleichzeitig in einem Ansatz nachweisen. Das Wesen der Erfindung zielt darauf ab, die Aussagen von zwei oder mehreren Testen in einem zu vereinen, wobei in dem Fall auf die exakte Erregerdiagnose verzichtet werden kann, wenn bereits einer der nachgewiesenen Erreger definierte antiepidemische Maßnahmen oder die Sperrung des biologischen Produktes nach sich zieht. Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß der Zwei-Seiten-Bindungsassay zum Antigennachweis mit der Brückenantikörpertechnik zum Antikörpernachweis kombiniert wird. Dazu wird bakterielles oder virales Antigen (z. B. gereinigt aus Viruslysate, rekombiniertes Antigen oder synthetische Peptide) entweder mit dem Antikörper zur Bindung des zusätzlich nachzuweisenden Antigens nach bekannten Verfahren an der festen Phase koimmobilisiert oder aber an den Antikörper kovalent gebunden, und nur dieser wird an der festen Phase nach bekannten Verfahren insolubilisiert. Im Falle der Kovalentbindung von Peptiden an den Antikörper wird dessen Reaktivität kaum beeinflusst, so daß mehrere (unterschiedliche) Peptide, die Sequenzen aus Proteinen **verschiedener** Erreger (z. B. HIV-1 und HIV-2) simulieren, koimmobilisiert werden können. Bei vorhandenem Antigen und/oder spezifischem Antikörper in der zu untersuchenden Probe wird ersteres von dem insolubilisierten Antikörper gebunden, während sich letzterer an das koimmobilisierte bzw. kovalent an den Antikörper fixierte Antigen bindet (Abb. 1 u. 2). Nach bekannten Verfahren werden die Proben zwischen 30–120 min bei 20–37 °C inkubiert und nach deren Entfernung durch Absaugen unspezifisch gebundene Bestandteile durch Spülung mit Waschpuffer bekannter Zusammensetzung entfernt. Im Anschluß daran erfolgt die Inkubation mit einer Kombination von markierten Antikörpern und markiertem Antigen oder markierten Antikörpern unterschiedlicher Spezifität (Abb. 1) bzw. die Inkubation mit einem markierten Antigen-Antikörperkonjugat (kovalente Bindung von Antigen an den Antikörper vor oder nach Markierung) über einen Zeitraum von 30–120 min bei 20–37 °C. Nach erneuter Abtrennung der ungebundenen Bestandteile erfolgt die Substratreaktion nach bekannten Verfahren bzw. die Radioaktivitätsmessung oder die Bestimmung der Fluoreszenzintensität.

Ausführungsbeispiel

Monoklonales anti-HBsAg IgG (finale Konzentration 10 mg/ml) wurde mit einem 21er Peptid aus dem envGenbereich von HIV-1 (Aminosäuresequenz 586–606) (Wang, J. J. G., S. Steel, R. Wisniewolski und C. Y. Wang: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 6159–6163 [1986]) mit Carbodiimid (finale Konzentration 5 mmol/l) im molaren Verhältnis 1:50 über 120 min bei 20°C nach bekannter Methode (Talamo, P. C., E. Haber und K. F. Austen: J. Immunol 101, 333–341 [1968]) gekoppelt und anschließend von freiem Carbodiimid und nicht gebundenem Peptid durch Gelfiltration über Sephacryl S 200 getrennt. Ein Teil dieses Konjugates wurde mit perjodataktivierter Meerrettichperoxidase (finale Perjodatkonzentration 10 mmol/l, Aktivierungsdauer 10 min, Abtrennung von freiem Perjodat durch Sephadex G-25 Gelfiltration) im molaren Verhältnis von IgG zu POD von 1:4 nach Wilson und Nakane (In: Knapp/Holubar/Wick (Hrsg.): Immunofluorescence and related staining techniques, Elsevier, Amsterdam, 1978, S. 215–221) über zwei Stunden bei Raumtemperatur gekoppelt. Die Konjugatstabilisierung erfolgte durch Reaktion mit Natriumborhydrid (finale Konzentration 5 mmol/l) über zwei Stunden bei 4 °C. Anschließend wurde überschüssiges Natriumborhydrid durch Dialyse gegen PBS entfernt.

Peptid-Antikörper Konjugat wurde in einer Konzentration von 10 µg IgG/ml nach bekanntem Verfahren (Catt, K. und G. W. Tregear, Science **158**, 1570–1572 [1967]) an der festen Phase (Polystyrenmikrotestplatten) adsorbiert. Anschließend wurde ein Serum mit bekanntem Gehalt an HBsAg und ein Serum mit Antikörpern gegen HIV-1 sowie ein Gemisch gleicher Volumenteile beider Seren geometrisch verdünnt und in jeweils separate Kavitäten 2 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Serumgemisch von 10 Einzelseren, die weder HBsAg noch anti-HIV-1 Antikörper enthielten, geometrisch verdünnt und unter gleichen Bedingungen in den Kavitäten inkubiert. Nach Abtrennung der ungebundenen Reaktanten erfolgte die Substratreaktion mit o-Phenylendiamin und H₂O₂ nach bekanntem Verfahren (T. Porstmann, B. Porstmann, R. Wietschke, R. von Baehr und E. Egger: J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **23**, 41–45 [1985]) und die Messung des Produktes bei 492 nm.

- Ergebnis:
- HBsAg ist in diesem Kombinationstest bis zu einer Konzentration von 1,0 µg/l nachweisbar (Abb. 3)
 - anti HIV-Antikörper (anti-gp 41) in einem positiv reagierenden Kontrollserum lassen sich in diesem Kombinationstest bis zu einer Verdünnung von 1:1 280 % nachweisen (Abb. 4)
 - das Gemisch der HBsAg-positiven und anti-HIV Antikörperhaltigen Probe weist eine höhere Extinktion als die entsprechenden Einzelproben auf (additiver Effekt) (Abb. 5)
 - das Gemisch der 10 negativen Seren überschreitet mit seiner Extinktion weder den Grenzwert für den Nachweis einer HBsAg-reaktiven Probe ($\bar{x}$ Ext. NKS + 0,05 Extinktionseinheiten) noch den Grenzwert für den Nachweis einer anti-HIV Antikörper-reaktiven Probe ($\bar{x}$ Ext NKS + 0,10 Extinktionseinheiten).

Abb. 1

Kombinationsteste zum simultanen Nachweis von Antigen und spezifischen Antikörpern durch Reaktanten-Koimmobilisierung:

1. Kombinationstest mit koimmobilisiertem Antigen und Antikörper und einem Gemisch aus markiertem Antigen und Antikörper.
2. Kombinationstest mit koimmobilisiertem Antigen und Antikörper und einem Gemisch markierter Antikörper unterschiedlicher Spezifität.

Abb. 2

Kombinationsteste zum simultanen Nachweis von Antigen und spezifischen Antikörpern durch Antigenstruktur-tragende Antigenkörper:

1. Kombinationstest mit 1-Antigenstruktur-tragendem immobilisierten und enzymmarkierten Antikörper.
2. Kombinationstest mit 2-Antigenstruktur-tragendem immobilisierten und enzymmarkierten Antikörper.

Abb. 3

Standardkurve für Hepatitis-B Oberflächenantigen im sukzessiven Zwei-Seiten-Immunoassay mit insolubilisierten und enzymmarkierten monoklonalen anti-HBs-Antikörpern ohne (○—○) und mit koimmobilisiertem und enzymmarkiertem HIV1-Antigen (●—●) (Assayprinzip 1, Abb. 1).

Abb. 4

Titration eines anti-HIV antikörperhaltigen Serums in der Antiglobulin (Sandwich)-technik (□—□) und in der Brückenantikörpertechnik mit koimmobilisierten und enzymmarkierten anti-HBs Antikörpern (●—●) sowie ohne koimmobilisierte und enzymmarkierte Antikörper (○—○) sowie die Reaktion eines Gemisches von 10 anti-HIV antikörpernegativen Seren in den drei Testvarianten.

Abb. 5

Extinktion eines Gemisches von 10 Normalseren (□), eines HBsAg positiven Serums (▣), eines anti-HIV antikörperhaltigen Serums (⊗) sowie eines HBsAg positiven Serums, welches anti-HIV Antikörper enthält (■).

Abb. 1

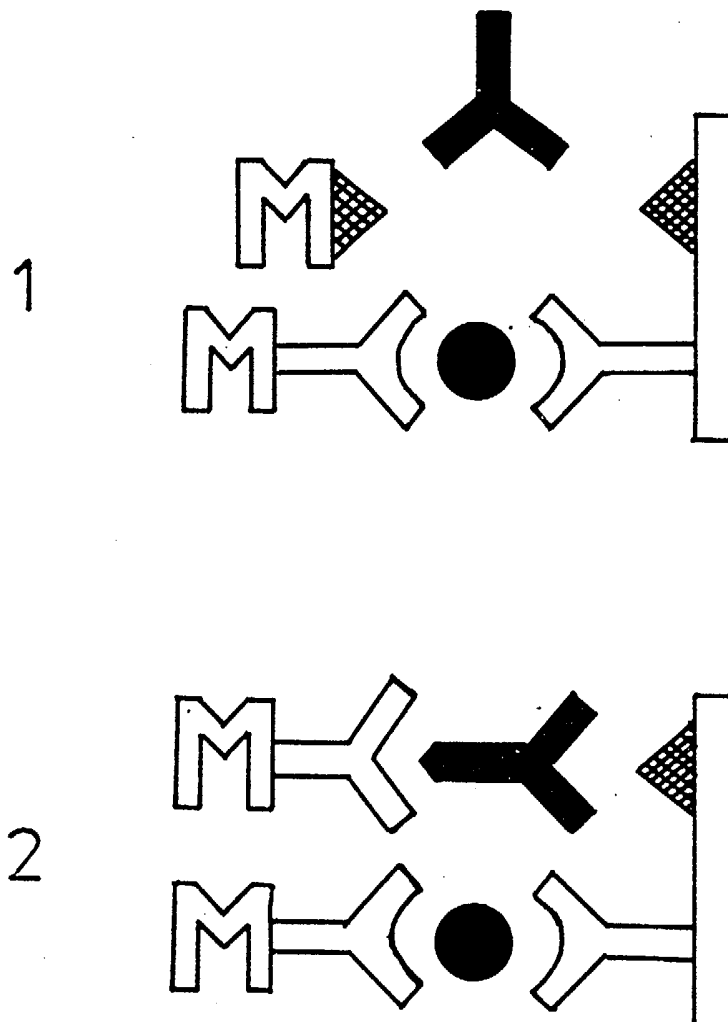


Abb. 2

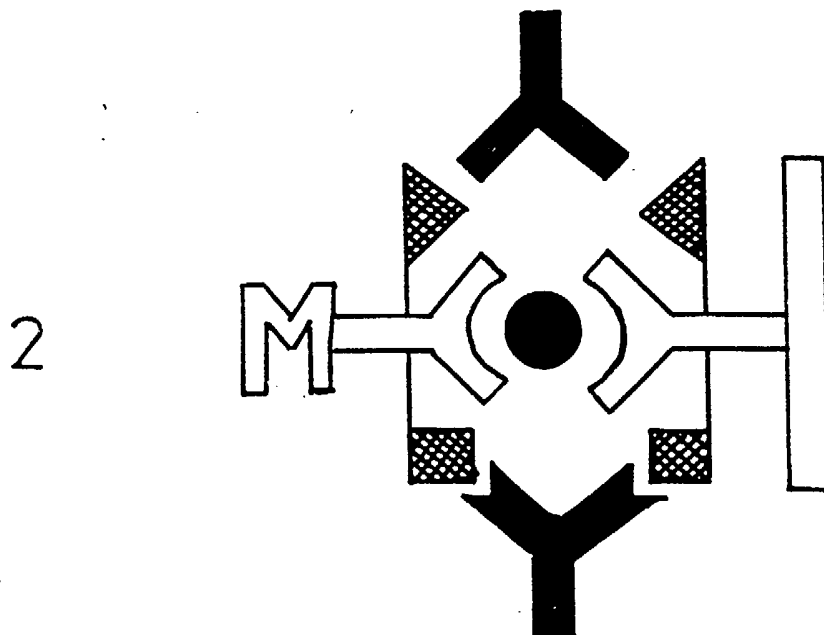
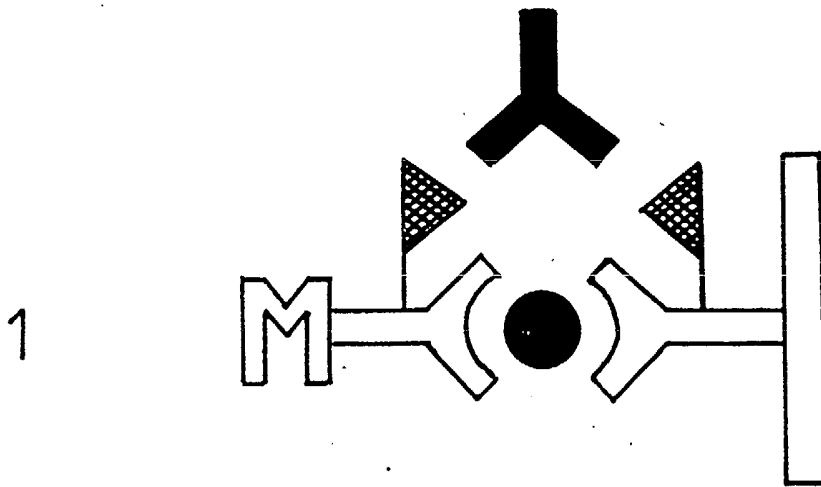


Abb. 3

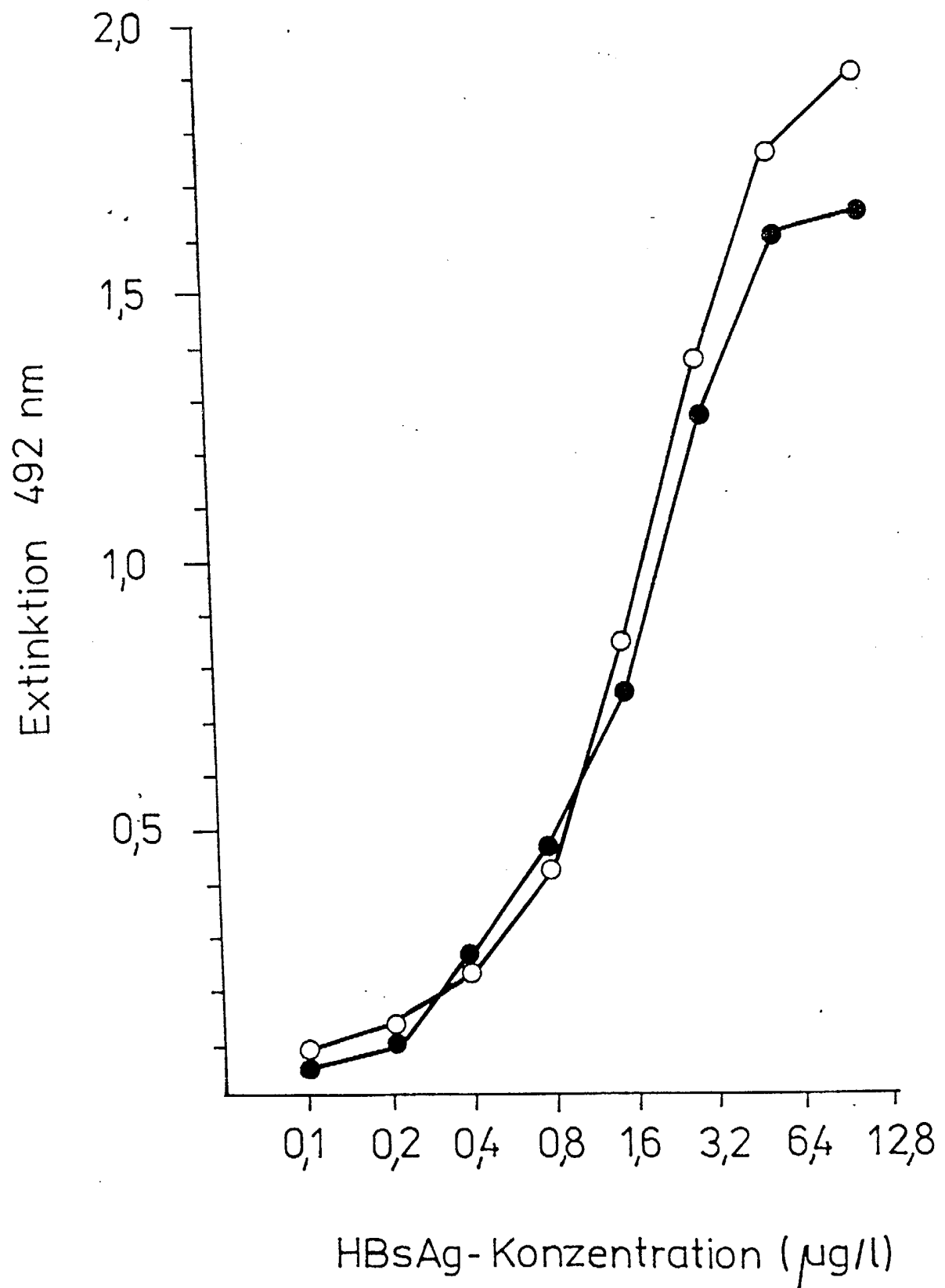


Abb. 4

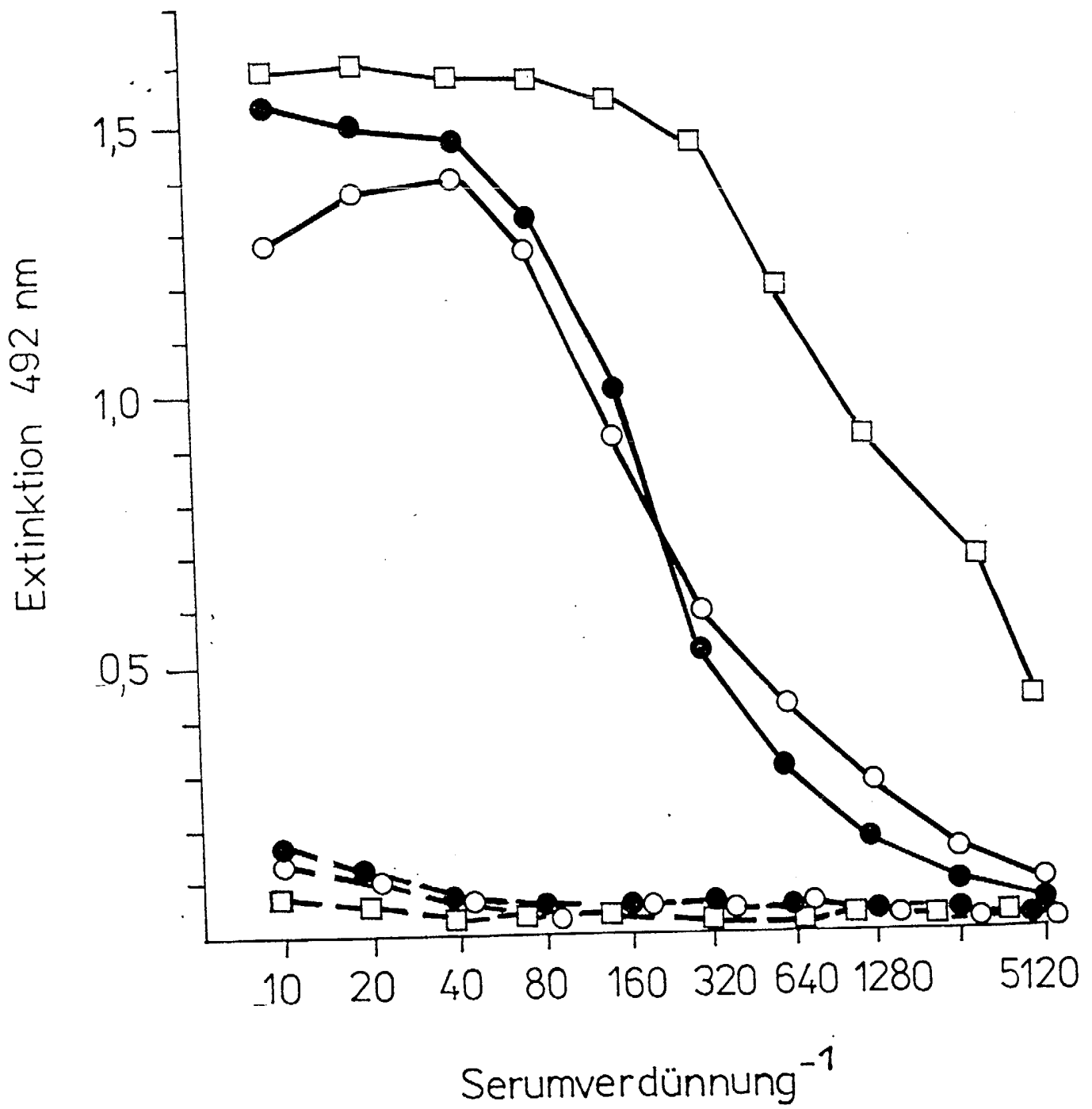


Abb. 5

