



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **264 458 A1**4(51) C 12.Q 1/06  
G 01 N 33/535

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	W P C 12 Q / 308 669 4	(22)	04.09.87	(44)	01.02.89
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Zacharias, Ute, Dipl.-Biochem.; Will, Horst, Prof. Dr. sc. Dr. rer. nat.; Schneider, Frank, Dipl.-Stom.; Hand-schack, Wilhelm, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Noll, Franz, Dr. Dr. sc. nat., DD				
(54)	<b>Immunoenzymometrisches Bestimmungsverfahren für den quantitativen Nachweis des humanen Plasmi-nogenaktivators Urokinase</b>				

(55) Immunoenzymometrisches Bestimmungsverfahren, humaner Plasminogenaktivator Urokinase, Antikörper, Adsorption, feste Phase, enzymmarkierter Antikörper, Enzymaktivität

(57) Die Erfindung betrifft ein Anwendungsgebiet der Erfindung sind die Medizin und die Biotechnologie. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß ein erster Antikörper gegen humane Urokinase an eine feste Phase adsorbiert wird, man die zu bestimmende urokinasehaltige Lösung zugibt und nach einer gewissen Inkubationszeit einen zweiten, mit einem Enzym markierten Antikörper hinzufügt und schließlich die Enzymaktivität des an der festen Phase fixierten Immunkomplexes mißt.

## Patentansprüche:

1. Immunenzymometrisches Bestimmungsverfahren für den quantitativen Nachweis des humanen Plasminogenaktivators Urokinase, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen ersten Antikörper an eine feste Phase adsorbiert, anschließend die zu messende urokinasehaltige Lösung, nach einer Inkubationszeit einen zweiten, enzymmarkierten Antikörper hinzufügt und die Enzymaktivität mißt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als ersten Antikörper einen polyklonalen oder einen monoklonalen Anti-Urokinase-Antikörper einsetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als zweiten Antikörper einen mit einem Enzym markierten monoklonalen oder polyklonalen Anti-Urokinase-Antikörper einsetzt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den monoklonalen Antikörper ZIM-UK-IH6 (DDR-0204), der mit Meerrettichperoxydase oder einem anderen Enzym markiert ist, einsetzt.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung von quantitativen Bestimmungen des humanen Plasminogenaktivators Urokinase, das für die medizinische Diagnostik, die biomedizinische Grundlagenforschung und bei der biotechnologischen Urokinaseherstellung benötigt wird.

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Humane Urokinase ist eine Serinprotease, die von Körperzellen sezerniert wird. Urokinase wandelt das Zymogen Plasminogen, das im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten vorkommt, in aktives Plasmin um. Das System Urokinase/Plasmin ist an der Katalyse diverser extrazellulärer proteolytischer Prozesse beteiligt (E. Reich in: *Biological Markers of Neoplasia: Basic and Applied Aspects* [R. N. Ruddon, ed.] Elsevier New York, 491-500 [1978]). Humane Urokinase wird als Therapeutikum für die Lyse thrombotischer Verschlüsse bei Herzinfarkt, Lungenembolie und anderen thrombotischen Erkrankungen eingesetzt (M. Verstraete et al., *Blood* **67**, 1529-1541, 1986). Urokinase ist weiterhin als Markerenzym für den Nachweis einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen, u. a. Tumorwachstum und Metastasierung, geeignet. Neben Urokinase existiert im humanen fibrinolytischen System noch ein zweiter, immunologisch und biochemisch verschiedener Typ von Plasminogenaktivator, nämlich der gewebspezifische Plasminogenaktivator (t-PA). Bisher erfolgt auch im internationalen Maßstab der quantitative Nachweis von Plasminogenaktivatoren über die Bestimmung ihrer katalytischen Aktivität, entweder direkt (Umsetzung eines chromogenen Substrates (Günzler, W. A. et al. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363** [1982] 133-141) oder indirekt über das von ihnen aktivierte Plasmin im Clot-Lysis-Test (Rijken, D. C. et al., *J. Biol. Chem.* **257**, 2920-2925, 1982) im Fibrinplattentest (Haverkate, F. et al., *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*, **4**, 25-31 [1979]) oder mittels eines chromogenen Substrates für Plasmin (Verheijen, J. H. et al., *Thromb. Haemostas.* **48**, 266-269, [1982]).

Diese Methoden sind störanfällig, abhängig von Modulatoren der Aktivität wie z. B. Detergenzien und werden durch die in biologischen Flüssigkeiten anwesenden Inhibitoren der Plasminogenaktivatoren und/oder des Plasmins beeinflusst. Die Proenzyme der Plasminogenaktivatoren mit geringer bzw. keiner enzymatischen Aktivität werden nicht erfaßt. Eine Differenzierung zwischen Urokinase und t-PA allein über die Aktivität ist nur z. T. möglich. Seit der Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen Urokinase (z. B. Herion, P. et al., *Bioscience Reports* **1**, 885-892, 1981) wurden mehrere immunchemische Methoden beschrieben, um schneller, sicherer und genauer als über die katalytische Aktivität Urokinase-Konzentrationen in Lösungen bestimmen zu können. Solche immunchemischen Verfahren auf der Grundlage des Einsatzes von monoklonalen Antikörpern können auf verschiedenen Testprinzipien beruhen:

- a) Radioimmunoassay als kompetitiver Bindungstest  
(Wojt, J. et al., *Wiener klin. Wochenschr.* **97** [5], 244-248, 1985)
- b) Immunenzymometrische Assays  
(Herion, P. et al., *Bioscience Reports* **3**, 381-388, 1983; Darras, V. et al., *Thromb. Haemostas.* **56** [3] 411-414, 1986; Stump, D. C. et al., *J. Biol. Chem.* **261** [3], 1267-1273, 1986; Nielsen, L. S. et al., *J. Immunoassay* **7** [3], 209-228, 1986)
- c) Enzymimmunoassay als kompetitiver Bindungstest  
(Nakamura, M. et al., *Cell Struct. Funct.* **9**, 167-179, 1984)

Die beschriebenen Verfahren nutzen mAk bzw. polyklonale Antikörper (aus Antiseren) gegen Urokinase in unterschiedlichen Kombinationen und Testverfahren, wobei Festphasensysteme und Verfahren in Lösung angewendet werden. Die erreichten Testparameter variieren hinsichtlich der Empfindlichkeit, der Zeitdauer, des Arbeitsaufwandes und des Detektionssystems (Radioaktivität, Enzymaktivität).

Bei den beschriebenen Festphasensystemen werden meist PVC bzw. Polystyroltestplatten als feste Phase eingesetzt. Die Beschichtung der festen Phase mit Antikörper erfolgt durch Benetzen der Oberfläche des Plastmaterials mit der antikörperhaltigen Lösung für eine gewisse Zeit.

Die Nachweisgrenzen der veröffentlichten Verfahren liegen zwischen 0,05 und 5 ng/ml.

Die Nachteile der bisher bekannten immunchemischen Verfahren zum quantitativen Nachweis von Urokinase sind in der Art und

Wiese der Beschichtung der Plastmaterialien, der z. T. sehr langen Reaktionszeiten, der langen Meßzeiten und der komplizierten Technik zur Trennung von freien und gebundenen Radioaktivitäten (bei auf kompetitiver Bindung beruhendem Radioimmunoassay) begründet. Häufig fehlt der eindeutige Nachweis, daß Urokinase-Inhibitorkomplexe und das Proenzym ebenfalls quantitativ bestimmt werden.

### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein rationelles und sicheres immunenzymometrisches Bestimmungsverfahren zum quantitativen Nachweis des humanen Plasminogenaktivators Urokinase zu entwickeln.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß wird ein erster Antikörper an eine feste Phase, z. B. an die Oberfläche der Näpfe von Mikrottestplatten aus Polystyrol oder einem anderen Material, wie z. B. PVC als Trägermaterial für den Festphasen-Immunoassay adsorbiert, vorzugsweise durch Antrocknen. Solche Antikörper-beschichteten Platten sind bei 4°C in trockenem Zustand für mehrere Wochen haltbar. In die Reaktionsnäpfe der mit Antikörper beschichteten Platten werden erfindungsgemäß nacheinander zuerst die zu messende urokinasehaltige Lösung, und nach einer Inkubationszeit ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper eingefüllt. Anschließend wird die Enzymaktivität des an der festen Phase fixierten Immunkomplexes gemessen. Als ersten Antikörper verwendet man einen polyklonalen Antikörper eines Vertebratenorganismus gegen Urokinase oder einen monoklonalen Antikörper, der mit Urokinase reagiert, und als zweiten Antikörper einen mit einem Enzym markierten polyklonalen oder monoklonalen Antikörper.

Ein bevorzugt eingesetzter mAk ist ZIM-UK-IH6 (DDR-0204), der mit Meerrettichperoxidase oder einem anderen aktiven Enzym markiert ist. Nach gründlichem Waschen der Reaktionsgefäße wird eine Substratlösung (Farbstoff) zugegeben, und nach angemessener Reaktionszeit die Reaktion durch Zugabe einer Säure gestoppt. Die entstandene Färbung in den einzelnen Näpfen der Mikrottestplatte wird schließlich durch photometrische Messung der Extinktion an einem entsprechend geeigneten Photometer quantifiziert.

Alle Arbeiten lassen sich bei Zimmertemperatur durchführen. Der Test läuft als „one-tube-assay“ und ist damit sehr einfach und leicht handhabbar. Die Testanordnung gestattet die gleichzeitige Bestimmung von vielen Proben durch eine Person in weniger als 5 Stunden.

Die Erfindung soll an einem Ausführungsbeispiel noch näher erläutert werden.

### Ausführungsbeispiel

Immunenzymometrisches Bestimmungsverfahren für den quantitativen Nachweis des humanen Plasminogenaktivators Urokinase:

Als Reaktionsgefäße werden die Näpfe von 96er-Mikrottestplatten verwendet. In die einzelnen Näpfe werden je 100 µl des ersten Antikörpers (polyklonale spezifische anti-Urokinase-Antikörper vom Kaninchen; 2 µg/ml Beschichtungspuffer der Zusammensetzung 0,015 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> — 0,035 M NaHCO<sub>3</sub> — 0,02 M NaN<sub>3</sub> — pH 9,6) einpipettiert und über Nacht angetrocknet. Anschließend werden die Näpfe der Mikrottestplatten mit je 200 µl TBS (Tris-gepufferte Salzlösung: 0,05 M Tris-0,2 M NaCl, pH 7,4-0,1% Tween 20) oder mit 200 µl einer proteinhaltigen Lösung in TBS gefüllt und zwecks Blockierung der noch freien proteinbindenden Stellen für 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert und dann wieder ausgegossen. Danach werden 100 µl einer Urokinase-Standard-Lösung bzw. der zu untersuchenden Probe verschiedenen Verdünnungsgrades eingefüllt und für 3 Stunden inkubiert (Schütteln in feuchter Kammer). Nach 3maligem Waschen mit H<sub>2</sub>O werden 50 µl des mit Peroxydase markierten mAk ZIM-UK-IH6 eingefüllt und für 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert (Schütteln in feuchter Kammer). Nach mindestens 5maligem Waschen mit H<sub>2</sub>O werden in die einzelnen Näpfe jeweils 240 µl einer Substratlösung z. B.

o-Phenylendiamin	0,4 mg/ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,015%ig
Phosphat-Zitrat-Puffer pH	5,0

einpipettiert und für einige Minuten (z. B. 15 Minuten) inkubiert. Mit 60 µl 2,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird die Farbreaktion in den Näpfen abgestoppt. Die Farbintensität in den einzelnen Näpfen wird schließlich photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

Aus der gemessenen Extinktion kann anhand der Standardkurve der Urokinase-Gehalt einer Lösung ermittelt werden.