

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



(12) Ausschließungspatent

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

PATENTSCHRIFT

(11) DD 295 927 A5

5(51) G 01 N 33/531

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD G 01 N / 315 443 6	(22)	06.05.88	(44)	14.11.91
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Sächsisches Serumwerk GmbH Dresden, Herbert-Bochow-Straße 40, O - 8012 Dresden, DE
(72)	Meisegeier, Bernhard, Dr. rer. nat.; Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med., DE
(73)	Sächsisches Serumwerk GmbH Dresden, O - 8012 Dresden; Humboldt-Universität, Institut für Medizinische Immunologie, O - 1040 Berlin, DE

(54)	Immobilisiertes immunologisch aktives Reagens
------	---

(55) immunologisch aktive Verbindungen; langzeitstabilisierte Reagenzien; Festphasen-Immuntechnik; Antikörper; Antigen; In-vitro-Nachweis; Immunoassay

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung stabilisierter immobilisierter immunologisch aktiver Verbindungen für Immunoassays beschrieben. Die nach dem „Kaschierprinzip“ langzeitstabilisierten immunologisch aktiven Reagenzien werden vorzugsweise für Festphasen-Immuntechniken zum In-vitro-Nachweis von Antikörpern oder Antigenen eingesetzt.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines immobilisierten immunologischen Reagens, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine immunologisch aktive Substanz an eine, einen Festphasenträger überziehende hydrophile Schicht gebunden und anschließend mit einem Medium gleicher Art überschichtet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die den Träger überziehende Schicht proteinogener Natur ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß Proteinderivate bzw. Proteinkonjugate als den Träger überziehende Schicht verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß wasserlösliche Polypeptide oder Proteine mit „random-coil“-Struktur eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die immunologisch aktive Substanz mit bekannten Methoden kovalent an die den Träger überziehende Schicht gebunden wird oder im Falle der Verwendung von Proteinderivaten bzw. Proteinkonjugaten als Träger-überziehende Schicht durch Protein-Rezeptur-Wechselwirkungen an die den Träger überziehende Schicht gebunden wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das zum Überschichten verwendete Medium Stickstoffverbindungen und Polyhydroxyverbindungen enthält.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Stickstoffverbindungen Aminocarbonsäuren oder nieder- oder höhermolekulare säureamidartig verknüpfte Aminocarbonsäuren darstellen.
8. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polyhydroxyverbindung ein Polyalkohol, ein Polyhydroxyaldehyd, ein Polyhydroxyketon, ein Derivat der Polyhydroxycarbonylverbindung, eine acetalartig verknüpfte Polyhydroxycarbonylverbindung ist.
9. Verwendung des nach Anspruch 1 hergestellten immunologischen Reagens, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Antigenen, wie Haptene, Viren, Bakterien, Pharmaka, Proteine, Allergene sowie von Antikörpern gegen die genannten Antigene und anderer biologisch aktiven Verbindungen, und daß es außerdem zur Reinigung und Isolierung korrespondierender Reaktionspartner, die mit der gebundenen immunologisch aktiven Substanz spezifische Wechselwirkungen eingehen, eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Immobilisierte Verbindungen haben in der Pharmazie, Biowissenschaft, Biotechnologie, Lebensmitteltechnik, Enzymologie, Medizin, Immunologie ein breites Anwendungsgebiet, z. B. zur schnellen und einfachen Abtrennung von Reaktionsprodukten und nicht gewünschten Begleitstoffen.

Immobilisierte immunologisch aktive Verbindungen werden insbesondere für immundiagnostische Zwecke, vorzugsweise für Festphasen-Immuntechnik und In-vitro-Nachweis oder zur Bestimmung eines immunologisch aktiven Reaktionspartners eingesetzt.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Der Nachweis oder die Bestimmung von Antigenen, Haptenen oder Antikörpern erfolgt vorzugsweise mittels immunologischer Methoden, die auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhen. Aufgrund der leichten Abtrennung der Reaktionsprodukte werden hierfür Festphasentechniken bevorzugt, bei denen ein Reaktionspartner an einen unlöslichen Träger gebunden ist. Das von K. J. CATT und C. W. TREGAR (Science 15 [1967] 1570) entwickelte Verfahren zur adsorptiven Bindung von Proteinen an polymere Kohlenwasserstoffe fand weite Verbreitung.

Die homogene Beschichtung des Trägers mit dem immunologischen Reaktionspartner ist eine Voraussetzung für sichere Resultatermittlungen bei Festphasenimmunoassays, ganz besonders bei der Erfassung medizinisch bedeutsamer Substanzen. Es gibt Versuche (DD 236 400, OS 2337 095), durch Vorbeschichtung mit bestimmten hydrophoben Verbindungen eine homogenere Beschichtung mit dem Immunreaktanten zu erreichen. Ebenso ist versucht worden, durch Behandlung der Oberfläche des Kunststoffträgers mit organischen Lösungsmitteln oder Säuren bessere adsorptive Eigenschaften des Trägers zu erzielen (DE 2509 895, DT 2509 895, I. C. SHEKARCHI et al. J. Clin. Microbiol. 19 [1984] 89 u. a.)

Das an den einen polymeren Träger gebundene empfindliche, biologisch, immunologisch aktive Material unterliegt dauernden, insbesondere hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Träger, partielle Strukturänderungen des immobilisierten Immunreaktanten und ein relativ schneller Verlust seiner immunologischen Aktivität sind die Folge.

Es ist bekannt, daß besonders an polymeren Kohlenwasserstoffen mit unpolarer Oberfläche wie Polystyren u. a. gebundene immunologisch aktive Moleküle, besonders Polypeptide und Proteine, durch hydrophobe Wechselwirkungen Konformationsänderungen unterliegen, wodurch nachfolgende Antigen-Antikörper-Reaktionen eingeschränkt oder unterbunden werden können, je nach Ausmaß der räumlichen Veränderungen. Darüber hinaus können sich eine Reihe von Antigenen, besonders niedermolekulare immunologisch aktive Stoffe wie Allergene, Peptide, bestimmte Haptene, aktive Amine, als Antigene wirkende Pharmaka u. a. nicht oder nur im unbefriedigenden Maße mit den üblichen Methoden an den festen Träger wie Polystyren binden.

Es wurde deshalb von verschiedenen Autoren versucht, Polystyren durch Einführung funktioneller Gruppen, z. B. Nitrogruppen, chemisch zu modifizieren (Übersicht: G. H. PARSONS: Methods in Enzymology 73 (1981), 224), um biologisch aktive Verbindungen, insbesondere auch Haptene, kovalent zu binden. Diese Verfahrensweise führte aber zu Verfärbungen der Reaktionsplatte und damit zu Störungen der Vertikal-Photometrie. Die direkten Wechselwirkungen mit dem polymeren hydrophoben Kohlenwasserstoff und damit verbundene Aktivitätsverluste werden dabei nicht unterbunden.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, eine feste Bindung einer ausreichenden Anzahl von Molekülen des zu immobilisierenden Immunreaktanten, eine Verminderung oder Unterbindung der Wechselwirkungen mit dem festen Träger, eine Beschichtung mit der immunologisch aktiven Verbindung unter standardisierten industriellen Bedingungen, einen möglichst langen Erhalt der immunologischen Aktivität, eine Verlängerung der Lagerzeit und eine Verminderung der Anfälligkeit gegenüber erhöhten Temperaturen und somit eine Langzeitstabilität des mit empfindlichen immunologisch aktiven Substanzen beschichteten Trägers zu erreichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat sich die Aufgabe gestellt, eine Verbesserung der Stabilität immobilisierter immunologisch aktiver Substanzen und gleichzeitig eine Erhöhung der Bindungsfähigkeit für bestimmte immunologisch aktive Verbindungen an den festen Träger zu erreichen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die zu immobilisierende immunologisch aktive Verbindung nach dem Kaschierprinzip und unter Ausnutzung des Spacereffektes an den festen Träger gebunden wird. Dies hat den Vorteil, daß direkte Wechselwirkungen der empfindlichen immunologisch aktiven Substanz mit der festen Matrix vermieden werden. Die Unterbindung dieser Wechselwirkungen erfolgt durch Auftragung einer Unterschicht einer inerten, die Struktur der immunologisch aktiven Verbindung nicht nachteilig beeinflussenden Verbindung. Eine Deckschicht gleicher Art von Verbindung erhöht den stabilisierenden Effekt.

Durch Ausnutzung funktioneller Gruppen der Unterschicht läßt sich die immunologisch aktive Verbindung mit geeigneten Substanzen über chemisch-kovalente Bindungen fest binden, gleichzeitig wird die Bindungsfähigkeit, insbesondere für Verbindungen mit relativ niedrigem Molekulargewicht, erhöht bzw. in manchen Fällen überhaupt erst realisiert. Gleichzeitig wird eine homogene Bindung erzielt. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung eignen sich alle Arten organischer und anorganischer polymerer Träger, die in der Medizin, Pharmazie, Tiermedizin, Biologie, Biochemie, Landwirtschaft usw. für immunologische Festphasentechniken eingesetzt werden.

Polystyren, deren Mischpolymerisate und Polyvinylchlorid werden für die Zwecke der vorliegenden Erfindung in Form von Mikrotitrationsplatten und anderen Reaktionsträgern oder Riegeln, die entsprechende Vertiefungen mit einem Fassungsvermögen von 10 bis etwa 1000 µl zur Ausführung der Immunreaktionen haben, besonders bevorzugt.

Als Unterschicht lassen sich erfindungsgemäß Substanzen proteinogener Struktur einsetzen.

Hierfür eignen sich insbesondere leicht zugängliche Polypeptide und Proteine wie tierische und menschliche Albumine (z. B. Rinderserumalbumin, Humanserumalbumin, Kaninchen-, Ziegen-, Schaf-, Pferd-, Schweineserumalbumin, Lactalbumin usw.), Globuline, Glykoproteine (wie Ovomuroid, Human-Choriogonadotropin) abgebaute Proteine, vorwiegend Abbauprodukte von Proteinen des Stütz- und Bindegewebes, Polyaminosäuren, bakterielle Proteine u. a.

Die Haftung der Unterschicht an den festen Träger kann unter Ausnutzung van der Waals'scher Kräfte, elektrostatischer oder anderer nicht-kovalenter Bindungskräfte oder im geeigneten Fall durch kovalente Bindung erfolgen.

Die Bindung an organische aliphatische und aromatische polymere Kohlenwasserstoffe wie Polyethylen, Polystyren u. a. wird in bekannter Weise durch Adsorption, vorzugsweise unter Ausnutzung hydrophober Wechselwirkungen des Trägers mit der proteinogenen Unterschicht erzielt. Eine Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen und damit eine besondere dichte und festhaftende proteinogene Unterschicht läßt sich vorteilhaft durch vorherige Überführung der Polypeptide oder Proteine „random-coil“-Struktur erreichen.

Zur Erzielung einer random-coil-Struktur eignen sich solche bekannten Verfahren wie Erhitzen, wobei vorzugsweise ein Bereich von 50 bis 80°C ausgewählt wird, Einwirkung von Ultraschall, Einwirkung ionisierender Strahlen, Einwirkung von Wasserstoffbrückenbindung-spaltenden chemischen Stoffen wie Harnstoff, Guanidin oder organische Lösungsmittel, pH-Wert-Änderungen.

Die Bindung des Immunreaktanten an die proteinogene inerte Unterschicht erfolgt kovalent mit bekannten Kupplungsreagenzien und herkömmlichen Kupplungsmethoden.

Beispielsweise kann der Immunreaktant mittels p-Phenylendiisothiocyanat, substituierter Di-Sulfonsäuren und anderer homobifunktionaler Reagenzien, mittels Dinitrodifluorbenzol, Acrolein-, Methacrolein, Methylglyoxal, Glutaraldehyd oder anderer ungesättigter Aldehyde; oder mit bifunktionalen Succinimidestern (wie Ethylenglycolbissuccinimidylsuccinat), Dissuccinimidyl-Carbonsäureester, Bis(2-succinimidooxycarbonyloxyethyl)sulfone; mittels heterobifunktionaler

Succinimidester von Maleinsäurederivaten, mittels Diazo-, Azid-, Säurechlorid-, Anhydrid-, Aktivestermethode, Carbodiimid-WOODWARD-Methode, Methode der aktivierten Amide, Carbodiimid-Methode unter Zusätzen wie N-Hydroxybenzotriazol, N-Hydroxysuccinimid u. a., Sulfonylthiocyanat-Methode u. a. an die Unterschicht gebunden werden. Ferner ist es möglich, Haptene mit der Hemisuccinat-, Oxim-, Mischanhydrid-Methode, N-Hydroxysuccinimidester- oder Carbodiimidester-Methode an die Unterschicht zu binden.

Wird als Unterschicht ein inertes Glykoprotein wie Ovomucoid, Ovalbumin, Humancnoriogonadotropin oder Immunglobulin verwendet, ist die Kupplung nach der Perjodat-Methode möglich, indem die OH-Gruppen der Zuckerreste des Glykoproteins zu Aldehydgruppen oxidiert und dann mit dem Immunreaktanten umgesetzt werden.

Eine besonders hohe Stabilität der an die Unterschicht gebundenen immunologisch aktiven Substanz wird erzielt, wenn mit einem Medium, das Amonocarbonsäuren bzw. säureamidartig verknüpfte Aminocarbonsäuren sowie Polyhydroxyverbindungen enthält, „überschichtet“ bzw. die Substanz damit eingebett wird.

Als Aminocarbonsäuren können natürliche Aminosäuren, einzeln oder als Gemisch oder als Proteinhydrolysat oder auch synthetische Aminosäuren oder Aminosäurederivate eingesetzt werden.

Als säureamidartig-verknüpfte Verbindungen bieten sich billig im Handel erhältliche Polypeptide, wie durch oxidativ-thermische Abbauvorgänge aus großtechnisch gewonnenen depolymerisierten Hydrolyseprodukten fibrillärer Skleroproteine des tierischen Bindegewebes kollagenen Ursprungs oder säure- und enzymatisch-hydrolytisch abgebaute Eiweiße, z. B. des Caseins, Lactalbumins, Sphäroproteine, Eiweiße verschiedener Ölsaaten und Leguminosen, der Getreidesamen in einer Konzentration von 0,006 g N/100 ml bis 5 g N/100 ml Lösung vorzugsweise 0,05 bis 1 g N/100 ml Lösung an.

Es kommen auch billig erhältliche, leicht zugängliche Proteine von Tier und Mensch, wie Albumine, Globuline, Lactalbumine u. a. oder Skleroproteine, wie Gelatine in Frage, die in einer Konzentration von 0,01 bis 20%, vorzugsweise 0,1 bis 2%, eingesetzt werden.

Als Polyhydroxyverbindungen werden insbesondere Monosaccharide und deren Derivate, z. B. Aldosen, Ketosen, Desoxyzucker, Zuckerester, Zuckersäuren, Zuckeralkohole, Zuckeranhydride, Anhydrozucker, ungesättigte Zucker, Aldonsäuren, Zuckercarbonylsäuren, Zuckeracetale, Zuckeräther, Cyclite und acetalartig-verknüpfte Polyhydroxycarbonylverbindungen, wie Oligosaccharide, vorzugsweise Disaccharide und Polysaccharide, wie Homopolysaccharide und Heterosaccharide verwendet. Konzentrationen von 0,5 bis 30%, vorzugsweise von 5 bis 20%, haben sich als besonders günstig erwiesen.

Die Inkubationszeit des Mediums soll mindestens 20 s betragen und kann bis auf mehrere Tage ausgedehnt werden.

Es ist erfindungsgemäß weiterhin in bestimmten Fällen vorteilhaft, für die „Unterschicht“ Proteinderivate oder Proteinkonjugate einzusetzen – wie Proteine, die an Aminogruppen, Carboxygruppen, Guanidino-, Imidazol-, Thioether-, Sulfhydryl- oder Hydroxygruppen mit:

- a) geeigneten, mit den funktionellen Gruppen des Proteins reagierenden organischen Gruppen, vorzugsweise substituierte aromatische Verbindungen, heterocyclische Verbindungen, z. B. 2-Ket-3,4-imidazolin-2-tetrahydrothiophen-n-valeriansäure u. a., die antigene Eigenschaften aufweisen oder mit anderen Haptenen oder künstlichen Antigenen
- b) Peptiden (homodet oder heterodet verknüpft), Peptidhormonen, Peptidantibiotika, Peptidtoxinen, Peptidalkaloiden, Peptoiden (Nucleo-, Phospho-, Lipo-, Glyko-, Chromopeptide), Depsipeptiden bzw. proteinogenen Konjugaten, z. B. peptidartig verbundenes 2-Ket-3,4-imidazolin-2-tetrahydrothiophen-n-valeryl-lysin,
- c) Proteinen, insbesondere Immunglobulinen; Enzymen,
- d) Vitaminen oder Vitaminderivaten
- e) Lectinen
- f) Polysacchariden
- g) Nucleinsäuren, Nucleotiden
- h) Zellen, Zellbestandteile, Bakterien oder Viren oder deren Bestandteile

substituiert bzw. kondensiert wurden.

Dieses bietet den Vorteil, daß nachfolgend die Bindung des im Test eingesetzten Immunreaktanten über Protein-Rezeptor-Wechselwirkungen erfolgt, wodurch weiter Aktivitätsverluste des Reaktanten, die sonst bei chemischen Reaktionen unumgänglich auftreten, vermieden werden.

Die Herstellung der als Unterschicht verwendeten Proteinderivate und Proteinkondensaten erfolgt in bekannter Weise mit herkömmlichen Kupplungsmethoden und Reaktionen, wie mittels Säurechlorid-, Anhydrid-, Aktivester-, Azid-, Diazo-, Carbodiimid-Methode oder anderen bekannten elektrophilen oder nucleophilen Substitutionsreaktionen („Organikum“, organisch-chemisches Grundpraktikum, Berlin 1985).

Nach Bindung des Immunreaktanten durch Protein-Rezeptur-Wechselwirkungen erfolgt erfindungsgemäß, wie bereits beschrieben, das „In-Kontakt-Bringen“ mit dem Überschichtungs-/Einbettungsmedium.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Jede Vertiefung einer Polystyren-Mikrotitrationsplatte (F-Form) wird mit 200 µl einer Lösung Rinderserumalbumins (100 µg/ml) in Carbonatpuffer (0,1 mol/l; pH 9,5), die auf 70°C erhitzt wurde, beschickt. Es wird 2 h bei 37°C stehengelassen, abgesaugt oder ausgekippt und zweimal mit Wasser gewaschen.

Die feuchten oder getrockneten Platten werden mit einer Lösung von Methylglyoxal (1,0%) in Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 5,8) 4 h bei 23 ± 5°C inkubiert und anschließend mit Phosphatpuffer gewaschen.

Anschließend werden 100 µl einer Immunglobulin-Lösung (5 µg anti-HBe-IgG/ml) in Phosphatpuffer (pH 7,6) pipettiert und 4 h inkubiert. Es wird mit Phosphatpuffer (0,01 mol/l), der Natriumchlorid (0,13 mol/l) enthält, zweimal gewaschen.

In jede Vertiefung der Platte werden 200 µl einer sterilfiltrierten Phosphat-Natriumchlorid-Lösung, die Pferdeserumalbumin (0,0003 mol/l) und alpha-D-Glucopyranosido-β-D-fructofuranosid (0,50 mol/l) enthält, pipettiert.

Nach 2 h Inkubation bei 23 ± 5°C wird abgesaugt, getrocknet und in wasserdampfdichter plastbeschichteter Aluminiumfolie eingeschweißt und bei 37°C gelagert.

Zur Messung der immunologischen Aktivität wird der P/N-Quotient ermittelt, der sich als Quotient aus der Extinktion der Positiv-Kontrolle und der Extinktion der Negativ-Kontrolle errechnet. Hierfür wird ein Teil der Mikrotitrationsplatte mit einem HBe-Antigen enthaltenen Serum (Positiv-Kontrolle) (je Vertiefung 100 µl) und der andere Teil mit der Negativ-Kontrolle (Serum, das kein HBe-Antigen enthält) beschickt. Es wird 2 h bei 37°C inkubiert, wie üblich mit Phosphat-Natriumchlorid-Puffer gewaschen, anschließend mit anti-HBe-IgG-Peroxidase-Konjugat (100 µl je Vertiefung) 2 h bei 37°C inkubiert und erneut gewaschen.

In jede Vertiefung werden 100 µl Phosphat/Citratpuffer pH 5,0, der 9 mmol o-Phenylendiamin und 7 mmol Wasserstoffperoxid enthält, pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 23°C wird mit 100 µl Schwefelsäure (1 mol/l) gestoppt und bei 492 nm die Extinktion ausgewertet. Der P/N-Quotient beträgt nach Lagerung bei 37°C: 10. Woche 12,5; 20. Woche 11,8 und vor der Lagerung 12,9. Zum Vergleich wird eine Polystyren-Mikrotitrationsplatte direkt mit anti-HBe-Immunglobulin in Carbonatpuffer beschichtet, 4 h bei 23 ± 5°C inkubiert, abgesaugt, mit Phosphatpuffer gewaschen, getrocknet und in plastbeschichteter Aluminiumfolie eingeschweißt.

Wie beschrieben, wird vor und nach Lagerung bei 37°C die immunologische Aktivität gemessen und der P/N-Quotient ermittelt. P/N-Quotient: vor Lagerung 10,2; 10. Woche nach Lagerung: 1,3

Beispiel 2

- A. Jede Vertiefung einer EIA-Reaktionsplatte wird mit 200 µl einer Lösung Ovalbumins, die einen Stickstoffgehalt von 1 mg/100 ml aufweist und zusätzlich 6 mol/l Harnstoff enthält, versetzt und bei 23°C aufbewahrt. Nach 4 h wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und 4 h bei 37°C getrocknet.
Jede Vertiefung der Platte wird mit 100 µl einer Lösung von 1-Ethyl-3-(3-N-N-dimethylaminopropyl)carbodiimid · HCl (0,05 mol/l) beschickt. Nach 1 h wird mit Wasser gewaschen. In jede Vertiefung werden 100 µl gereinigten Röteln-Virus-Antigens (HA-Titer 1:8) pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h (37°C) wird gewaschen. Jede Vertiefung wird mit 200 µl einer Lösung, die Albumin aus dem Serum vom Rind (5,0 g/l) und 0,50 mol alpha-D-Glucopyranosido-beta-D-fructofuranosid enthält, gefüllt. Nach 3 h wird abgesaugt, getrocknet, in wasserdampfdichter Folie eingeschweißt und gelagert.
- B. Jede Vertiefung einer EIA-Reaktionsplatte wird mit 100 µl gereinigten Röteln-Virus-Antigens (HA-Titer 1:8) beschickt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h (37°C) wird gewaschen. Die Platten werden getrocknet, in wasserdampfdichter Folie eingeschweißt und gelagert.
- C. Die immunologische Aktivität wird im Enzymimmunoassay bestimmt.
Hierzu werden die mit Phosphat/Natriumchlorid/Tween-Puffer gewaschenen Vertiefungen der Platte mit 100 µl eines Serums, das mit einer Pufferlösung (0,01 M Phosphat/0,13 M Natriumchlorid/10% Schafserum, 0,05% Tween 20, pH 7,2) im Verhältnis 1:200 verdünnt ist und IgG-Antikörper gegen Röteln-Virus enthält, beschickt und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Waschen werden je Vertiefung 100 µl eines Phosphatase-markierten anti-human-Fc-Antikörpers (1 µl/ml) pipettiert. Nach 45 min Inkubation bei 37°C und Stoppen mit 100 µl Natriumhydroxidlösung (2 mol/l) wird durch Vertikalphotometrie bei 405 nm die festphasengebundene enzymatische Aktivität bestimmt.
Nach 10 Tagen Lagerung bei 37°C wurden bei A 93% und bei B 18%, nach 30 Tagen Lagerung bei 37°C bei A 89% und bei B 0% der nach der Trocknung erhaltenen immunologischen Aktivität wiedergefunden.

Beispiel 3

- A. Die Oberfläche jeder Vertiefung der EIA-Reaktionsplatte (F-Form) wird mit Rinderserumalbumin beschichtet, wie im Beispiel 1 beschrieben.
Die feuchten oder getrockneten Platten werden mit einer Lösung von Glutaraldehyd (5 mg/ml) in Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 6,8) 2 h bei 23°C ± 5 K inkubiert und anschließend mit Phosphatpuffer gewaschen.
In jede Vertiefung der Platte werden 200 µl einer Lösung Toxoplasma-Lysat-Antigens (25 µg/ml), das auf bekannte Art und Weise nach WP G 01 N/2307405 hergestellt wurde, pipettiert und 2 h bei 37°C und 1 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach Waschen wird jede Vertiefung mit 250 µl einer Lösung, die partiell abgebaute Gelatine („Gelafusal“-Infusionslösung, 1,5 mg N/ml) und 4-(beta-D-Galactopyranosido)-D-glucopyranose (0,6 mol/l) enthält, beschickt.
Nach 2 h (23°C) wird abgesaugt, getrocknet, eingeschweißt und gelagert.
- B. Jede Vertiefung der EIA-Reaktionsplatte wird mit 200 µl Toxoplasma-Lysat-Antigen-Lösung (25 µg/ml) beschickt. Nach Inkubation über 16 h bei 2 bis 8°C wird abgesaugt, gewaschen und jede Vertiefung wird mit 250 µl einer Lösung, die analog „Gelafusal“-Lösung und 4-/beta-D-Galactopyranosido)-D-glucopyranose enthält, gefüllt. Nach 2 h (23°C) wird abgesaugt, getrocknet und in wasserdampfdichter Verpackung eingeschweißt und gelagert.
- C. Die Messung der immunologischen Aktivität erfolgt, wie im Beispiel 2 C beschrieben, wobei anstelle des Röteln-Serums ein Anti-Toxoplasma-Serum verwendet wird, das 0,2 IE Antikörper gegen Toxoplasmen enthält.
Nach 20 Tagen Lagerung bei 37°C wurden bei A 86% und bei B 51% der nach der Trocknung erhaltenen immunologischen Aktivität wiedergefunden.

Beispiel 4

- A. Wie im Beispiel 1 beschrieben, wird die Oberfläche der Vertiefungen von EIA-Reaktionsplatte mit Serum vom Rind beschichtet und anschließend mit Wasser gewaschen. Jede Vertiefung der Platte wird mit 100 µl einer wäßrigen Lösung von 1-Ethyl-3-(3-N-N-dimethylaminopropyl)carbodiimid · HCl (2 mg/ml) beschickt. Nach 2 Stunden wird mit Wasser gewaschen. In jede Vertiefung werden 100 µl eines Pollenextraktes (500 NOON) der Gräser Phleum pratense, Poa pratensis, Lolium perenne pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 1 h (37°C) wird gewaschen. Jede Vertiefung wird mit 200 µl einer Lösung, die Rinderserumalbumin (0,1 mmol/l) und 0,50 mol alpha-D-Glucopyranosido-beta-D-fructofuranosid enthält, gefüllt. Nach 2 h wird abgesaugt, getrocknet, in wasserdampfdichter Folie eingeschweißt und gelagert.
- B. EIA-Reaktionsplatten werden in bekannter Weise mit dem 3-Gräserpollenextrakt (0,1 M Carbonatpuffer pH 9,0; 16 h, 20°C) beschichtet. Nach Waschen wird analog A mit einer Lösung Albumins und alpha-Glucopyranosido-beta-D-fructofuranosid überschichtet, getrocknet, eingeschweißt, gelagert.
- C. Zur Ermittlung der immunologischen Aktivität werden die mit Allergen beschichteten Platten je Vertiefung mit 100 µl eines Serums, das mit 100 Teilen Phosphat (0,01 M)-Natriumchlorid (0,15 M)-Puffer (pH 7,2) verdünnt ist und spezifische IgE-

Antikörper gegen Gräserpollenallergene enthält, beschickt. Nach 2 h (23°C) wird abgesaugt und gewaschen. Nach Zugabe eines monoklonalen Maus-anti-IgE-Antikörpers (1:600 verdünnt in phosphatgepufferter Natriumchlorid-Lösung (0,15 mol/l), der Rinderserumalbumin (20 mg/ml) zugesetzt wurde); wird 2 h (23°C) inkubiert und abgesaugt. Nach Reaktion (2 h, 23°C) eines peroxidasemarkierten anti-Maus-Antikörpers (Ziege) (0,6 µg/ml) (100 µl je Vertiefung) wird die festphasengebundene Enzymaktivität durch Umsatz mit o-Phenylendiamin/Wasserstoffperoxid-Reagens, wie im Beispiel 1 beschrieben, ermittelt.

Nach dem Trocknen wurde bei A:E = 1,542 bei B:E = 1,040 und nach Lagerung über 30 Tage bei $23 \pm 5^\circ\text{C}$ wurde bei A:E = 1,420 und bei B:E = 0,803 ermittelt.