

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

(11) **DD 289 603 A5**

5(51) G 01 N 33/577
G 01 N 33/535
G 01 N 33/531

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD G 01 N / 331 259 6 (22) 28.07.89 (44) 02.05.91

- (71) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat Forschung, Unter den Linden 6, O - 1080 Berlin; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Straße 116, W - 6800 Mannheim 31, DE
- (72) Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med.; Meißner, Katrin, Dipl.-Biochem.; Rüdinger, Wolfgang, Dr. rer. nat. Dr. med., DE
- (73) Humboldt-Universität, Bereich Medizin (Charité), O - 1040 Berlin, DE
-

(54) **Verfahren, Festphasenimmunoassay und Testbesteck zur Bestimmung der Aktivität reverser Transkriptase (RT)**

(55) Retroviren; reverse Transkriptase; RT; Nachweis; HIV-1; AIDS; Festphasenimmunoassay;

Bromdeoxyuridintriphosphat; BrdUTP; Antikörper; monoklonale Antikörper; Medizin; Diagnostik; Pharmazie

(57) Die Erfindung betrifft die Bestimmung der Aktivität reverser Transkriptasen (RT) in Retroviren, z. B. die des die Immunschwäche AIDS verursachenden HIV-1. Mit Hilfe des Bromdeoxyuridintriphosphats (BrdUTP) gelingt die RT-Bestimmung im Festphasenimmunoassay und damit der Nachweis von Retroviren unter Verwendung monoklonaler Antikörper und unter Umgehung radioaktiver Nukleotide. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik und die pharmazeutische Industrie.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität reverser Transkriptase (RT), **dadurch gekennzeichnet**, daß Bromdeoxyuridintriphosphat (5-Brom-2-deoxy-uridin-5-triphosphat, BrdUTP) zur Strangpolymerisation eingesetzt wird, welches in einer Nachfolgereaktion durch einen Festphasenimmunoassay quantifiziert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die jeweils zu bestimmende reverse Transkriptase vor dem Aktivitätstest durch eine immunologische Reaktion mit einem für diese RT spezifischen insolubilisierten Antikörper aus biologischem Material selektiv gebunden und der RT-Aktivitätstest mit einem auf diese Weise insolubilisierten Enzym durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein RT-Puffer Verwendung findet, der neben RSA, Poly(rA)dT₁₈, Tris/HCl, DTT, MgCl₂, KCl, EGTA, Glutathion, Glycerol und Triton X-100 zusätzlich Bromdeoxyuridintriphosphat (BrdUTP) enthält.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß polymerisiertes BrdUTP durch einen Zwei-Schritt-Immunoassay mit Hilfe insolubilisierter und enzymmarkierter monoklonaler anti-Bromdeoxyuridin(BrdU)-Antikörper nachgewiesen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die RT-Aktivität des HIV-1 gemessen wird, indem die RT aus einem HIV-1-Lysat durch einen insolubilisierten anti-HIV-1-RT-Antikörper isoliert und die RT-Reaktion mit BrdUTP durchgeführt wird und der Poly(BrdU)-Strang entweder in einem Zwei-Schritt-Assay mit insolubiliertem anti-BrdU-Antikörper, gefolgt von einer Konjugatinkubation mit Peroxidase-markiertem anti-BrdU-Antikörper oder im simultanen Ein-Schritt-Assay zusammen mit dem Konjugat und den insolubilisierten Antikörpern reagiert.
6. Testbesteck zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 5, bestehend aus a) festen Phasen, wie Mikrotiterplatten oder Röhrchen, mit immobilisierten anti-HIV-1-RT-Antikörpern bzw. immobilisierten anti-BrdU-Antikörpern, b) festen Phasen mit insolubilisierten Antikörpern, c) mit Peroxidase markierten anti-BrdU-Antikörpern, d) einem RT-Puffer, enthaltend BrdUTP, e) Natronlauge, f) einem Citrat-Phosphatpuffer, g) einem Substratgemisch zum Nachweis von Peroxidase, h) einem Stoppreagens für die Peroxidase-reaktion, i) Verdünnungsmedien für Proben und Konjugate, j) Waschpuffer und k) Kontrollmaterialien.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Nicht-Isotopen-Verfahren zum Nachweis der Aktivität reverser Transkriptase. Das Verfahren findet vorrangig Anwendung in der molekularbiologischen Grundlagenforschung und in der angewandten Medizin und Veterinärmedizin auf dem Gebiet der Virologie zur Charakterisierung und zum Nachweis von Retroviren, darüber hinaus in der Pharmakologie und pharmazeutischen Industrie zur Überprüfung der Wirksamkeit von Hemmsubstanzen der reversen Transkriptase.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Der Nachweis der Aktivität reverser Transkriptase erfolgt ausschließlich durch die Polymerisation Tritium-markierter oder ³²Phosphor-markierter Deoxynukleosid-Triphosphate an einer Einzelstrangmatrize (Template, meist Poly(rA) der Kettenlänge 100) mit Startersequenzen (Primer, meist Oligo(dT) der Kettenlänge 10-20) (D. Baltimore und D. Smoler: Proc. Natl. Acad. Sci. 68 [1971], 1507-1511). Der Einsatz der mit radioaktiven Isotopen markierten Nukleotide begrenzt diese Methode auf wenige Labore und ist mit allen Nachteilen, die aus dem Umgang mit radioaktivem Material herrühren, behaftet, wie z. B. der Substanzlagerung, den erforderlichen Genehmigungen zum Umgang mit diesen Substanzen, der Versuchsdurchführung in Speziallaboratorien sowie der Abfallbeseitigung. Darüber hinaus eignet sich diese Methode nur bedingt zur Automatisierung, verursacht durch die notwendige Präzipitation des Reaktionsproduktes auf eine Matrix, in der dann die radioaktiven Zerfälle gemessen werden.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, den Einsatz von radioaktiven Isotopen bei der Bestimmung der reversen Transkriptase (RT) zu umgehen, die Bestimmung der RT zu automatisieren und die jeweilige RT spezifisch zu erfassen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren, einen Festphasenimmunoassay und ein Testbesteck zu entwickeln, die einerseits den Einsatz von mit radioaktiven Isotopen markierten Nukleotiden umgehen, andererseits einen hohen Automatisierungsgrad zulassen und darüber hinaus die diagnostisch relevante reverse Transkriptase spezifisch erfassen.

Die prinzipielle Lösung der Aufgabe besteht darin, daß z. B. Tritium markiertes Thymidintriphosphat ($^3\text{HTTP}$) gegen Bromdeoxyuridtriphosphat (5-Brom-2-deoxy-uridin-5-triphosphat, BrdUTP) ausgetauscht wird. Das an der Matrize, Poly(rA), polymerisierte BrdUTP wird durch einen Zwei-Seiten-Immunoassay unter Einsatz insolubilisierter und markierter monoklonaler anti-BrdU-Antikörper nachgewiesen. Die monoklonalen anti-BrdU-Antikörper werden mit einem Enzym, z. B. Peroxidase, markiert, um so die reverse Transkriptase indirekt über den in dem Immunkomplex gebundenen Poly(BrdU)-Strang zu quantifizieren. Da das eingebaute BrdU in dem durch die RT gebildeten Doppelstrang aus Poly(A) und Poly(BrdU) nicht für die Antikörper im Zwei-Seiten-Immunoassay zugänglich ist, muß vorher noch der Abbau des komplementären Poly(A)-Stranges durch thermische Strangschmelzung oder alkalische Hydrolyse erfolgen (T. Porstmann, T. Ternyck und S. Avrameas: *J. Immunol. Methods* **82** [1985], 169–179).

Um eine spezifische RT (z. B. die des die menschliche Immunschwäche AIDS verursachenden Retrovirus HIV-1) zu messen, wird vor der eigentlichen RT-Reaktion die reverse Transkriptase aus dem Viruslysate durch einen insolubilisierten anti-HIV-1-RT-Antikörper isoliert. Nach einer Inkubationszeit des Viruslysats in mit monoklonalen anti-HIV-1-RT-Antikörpern beschichteten Kavitäten einer Mikrotiterplatte oder Röhrchen bzw. Kugeln zwischen 60 und 240 min (vorzugsweise 90 min) bei 20 bis 25°C werden alle nicht gebundenen Bestandteile durch Absaugen der Flüssigkeit und mehrmaliges Spülen der Kavitäten, Röhrchen bzw. Kugeln mit Pufferlösungen bekannter Zusammensetzung entfernt. Anschließend wird die RT-Reaktion mit BrdUTP in Konzentrationen zwischen 0,005 und 0,05 mmol/l (vorzugsweise 0,01 mmol/l) und Poly(A) ($(dT)_{10}$) in Konzentrationen zwischen 0,007 und 0,25 mmol/l (vorzugsweise 0,015 mmol/l) über 60–240 min (vorzugsweise 90 min) bei 37°C in Pufferlösungen bekannter Zusammensetzung (A. Hoffmann, B. Banapour und A. J. Levy: *Virology* **147** [1985], 326–335) durchgeführt. Der Reaktionsabbruch erfolgt durch Zugabe von 0,4 mol/l NaOH. Die Inkubationszeit zur Poly(rA)-Degradation beträgt 5–30 min (vorzugsweise 10 min). Nach anschließender Neutralisation durch Zugabe eines 0,5 mol/l Citrat-Phosphatpuffers pH 7,0 erfolgt der Probentransfer in die Immunoassayplatte oder -röhrchen. Hier reagiert der Poly(BrdU)-Strang entweder im sukzessiven Zwei-Schritt-Assay 60–120 min (vorzugsweise 90 min) bei 37°C mit dem insolubilisierten anti-BrdU-Antikörper, gefolgt von einer 60–120minütigen (vorzugsweise 90minütigen) Konjugatinkubation (Peroxidase-markierter anti-BrdU-Antikörper) oder aber im simultanen Ein-Schritt-Assay zusammen mit dem Konjugat und den insolubilisierten Antikörpern über 60 bis 120 min (vorzugsweise 90 min) bei 37°C. Nach Abtrennung der ungebundenen Komponenten erfolgt die Substratreaktion wahlweise mit den Chromogenen ABTS, oPD oder TMB und H_2O_2 nach bekannten Verfahren (B. Porstmann, T. Porstmann und E. Nuge: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **19** [1981], 435–439; T. Porstmann, B. Porstmann, R. Wietschke, R. von Baehr und E. Egger: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **23** [1985], 41–44). Die Extinktionsbestimmung erfolgt durch Photometrie.

Das erfindungsgemäße Testbesteck zur Bestimmung der RT-Aktivität ist ein Festphasenimmunoassay, der aus a) festen Phasen, z. B. Mikrotiterplatten oder Röhrchen mit immobilisierten Antikörpern zur Isolation der RT aus einem HIV-1-Lysat und b) festen Phasen (s. o.) mit insolubilisierten Antikörpern zur Bindung von polymerisiertem BrdUTP, c) Peroxidase markierten Antikörpern zum Nachweis des im Immunkomplex gebundenen Poly-BrdUTP im Ein- bzw. Zwei-Schritt-Assay, d) einem RT-Puffer (Konzentrat, enthaltend BrdUTP), e) Natronlauge für den Abbruch der Polymerisation und für die Strangtrennung, f) Citrat-Phosphatpuffer (Konzentrat) für die Vorbereitung des Enzymimmunoassays, g) einem Substratgemisch zum Nachweis von Peroxidase, h) einem Stoppreagens für die Peroxidase-Reaktion, i) Verdünnungsmedien für Proben und Konjugate (Konzentrat), j) Waschpuffer (Konzentrat) und k) Kontrollmaterialien, besteht.

Die verwendeten monoklonalen anti-BrdU-Antikörper werden durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit 5-Brom-2-uridin-ovalbumin und Immortalisierung ihrer Milzlymphozyten mit Zellen der Mausmyelomzelllinie P3X63HG8/653 zu den Hybridomzelllinien H-CB-Bru 1 und 2, deren Selektion, Züchtung und Aufarbeitung des zellfreien Überstandes gewonnen.

Ausführungsbeispiele

1. Methodik

Ein monoklonaler Antikörper gegen RT von HIV-1 (IgG 1), gereinigt durch Ammoniumsulfatpräzipitation, Ionenaustauschchromatographie an Mono Q-Sephrose und hydrophober Interaktionschromatographie an Phenyl-Superose wird mit 0,1 mol/l Karbonatpuffer, pH 9,5, nach bekanntem Verfahren (K. Catt und G. W. Traeger, *Science* **158** [1967], 1570–1572) über Nacht bei 20–25°C an die Oberfläche von Polystyrenmikrotiterplatten (Kavitätenvolumen 400 µl; Flow Laboratories, Meckenheim, BRD) adsorbiert (Benetzungsvolumen 100 µl pro Kavität).

Nach gleichem Verfahren wird ein monoklonaler anti-BrdU-Antikörper (IgG 1), gereinigt nach o. g. Fällungs- und Chromatographieschritten, an die Oberfläche von Polystyrenmikrotiterplatten (Typ: Maxisorb, Nunc, Dänemark) (Benetzungsvolumen 100 µl/Kavität) adsorbiert.

Nach Absaugen der jeweiligen Antikörperlösungen und einmaliger Spülung der Kavitäten mit Aqua dest. erfolgt eine Nachbenetzung der mit anti-RT-Antikörpern beschichteten Polystyrenplatte mit nukleasefreiem Rinderserumalbumin (RSA) (Boehringer Mannheim, BRD) (Beschichtungskonzentration 10 g/l) und 5% (w/v) Saccharose, gelöst in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,2 (Nachbeschichtungslösung) über 60 min bei 20–25°C. Die mit anti-BrdU-Antikörpern beschichteten Platten werden mit der gleichen Lösung nachbeschichtet, wobei das nukleasefreie RSA gegen RSA reinst (Serva, Heidelberg, BRD) ausgetauscht wird.

Zusätzlich werden Mikrotiterplatten (Flow Laboratories, Meckenheim, BRD, Kavitätenvolumen 400 µl) nur mit nukleasefreier RSA-haltiger Nachbeschichtungslösung beschichtet (Benetzungsvolumen 200 µl/Kavität).

Anschließend wird die Flüssigkeit aus den Kavitäten abgesaugt, und die Platten werden 30 min bei 37°C mit Luftumwälzung im Brutschrank nachgetrocknet. Vor Testbeginn werden die Kavitäten einer beschichteten Platte einmal mit Waschpuffer (0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,3 mol/l NaCl, 0,1% [v/v] Tween 20) gespült und anschließend trockengesaugt.

2. Beispiele

2.1. Allgemeiner RT-Aktivitätstest zur Bestimmung der HIV-1-RT aus Viruslysate

50,0 µl HIV-1-RT enthaltendes Viruslysate, gereinigt aus dem Kulturüberstand HIV-1 infizierten Lymphozyten durch Fällung über Nacht mit 30% (w/v) Polyethylenglycol 6000 (Serva, Heidelberg, BRD), finale Konzentration 10% (w/v), Zentrifugation bei 6000 U/min über 10 min bei 4°C und anschließender Pelletierung des Virus bei 25000 U/min über 60 min bei 4°C, welches in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,8, 2 mmol/l Dithiothreitol, 0,2% (v/v) Triton X-100 (Serva, Heidelberg, BRD) und 20% (v/v) bidestilliertem Glycerol aufgenommen wird, werden zusammen mit 50 µl RT-Puffer folgender Zusammensetzung

Substanz	finale Konzentration
RSA	0,1 mg/ml
BrdUTP	0,015 mmol/l
Poly(rA) (dT) ₁₈	0,02 mmol/l
Tris/HCl pH 8,1 (Serva)	50 mmol/l
DTT	5 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
KCl	150 mmol/l
EGTA	0,5 mmol/l
Gluthation	0,3 mmol/l
Glycerol	0,1 %
Triton X-100	0,05 %

in den nur mit nukleasefreien RSA-beschichteten Platten 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 50 µl/Kavität 0,4 mol/l NaOH zugegeben, und nach einer Hydrolysezeit von 15 min bei 37°C wird die Lösung durch Zugabe von 100 µl/Kavität 0,5 mol/l Citrat-Phosphat-Puffer, pH 7,0, neutralisiert. 50 µl dieser Lösung werden in die mit monoklonalem anti-BrdU-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten dosiert, in deren Kavitäten unmittelbar zuvor 50 µl Peroxidase markierte monoklonale Antikörper, eingestellt auf eine Konzentration von 5 g IgG/l, dosiert wurden. Nach kurzem Schütteln wird das Reaktionsgemisch 120 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Gemisch abgesaugt, und die Kavitäten werden dreimal mit Waschlösung (0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,2; 0,3 mol/l NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen. Nach Abtrennung der ungebundenen Reaktanten erfolgt die Substratreaktion mit o-Phenylendiamin und Wasserstoffperoxid (100 µl je Kavität) nach bekanntem Verfahren (T. Porstmann, B. Porstmann, R. Wietschke, R. von Baehr und E. Egger: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23 [1985], 41-44) durch Zugabe von 100 µl/Kavität. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wird die Enzym-Substratreaktion durch Zugabe von 100 µl/Kavität 2,0 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Anschließend werden die Kavitäten bichromatisch bei 492 und 690 nm vermessen.

2.2. Allgemeiner RT-Aktivitätstest zur Bestimmung von hochgradig gereinigter AMV-RT

Hochgradig gereinigte AMV-RT (Boehringer Mannheim, BRD) wurde mit dem BrdUTP- und Template-Primer freien RT-Reaktionspuffer (siehe Beispiel 1) auf eine Volumenaktivität von 0,20 U/ml eingestellt und von hier bis zu einer Aktivität von 0,02 U/ml linear verdünnt.

50 µl von den AMV-RT-Lösungen der unterschiedlichen Aktivität wurden zusammen mit 50 µl doppelt konzentriertem RT-Reaktionspuffer mit BrdUTP und Template-Primer in den mit nukleasefreiem RSA beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte inkubiert. Alle übrigen Reaktionsbedingungen gleichen denen von Beispiel 1. Von dem AMV-RT-freien RT-Reaktionspuffer wurden 21 Bestimmungen als Leerwertkontrolle durchgeführt. Die Summe aus dem Extinktionsmittelwert dieser Bestimmungen und dessen dreifacher Standardabweichung wurden als untere Nachweisgrenze definiert. Zur Einschätzung der analytischen Empfindlichkeit wurden verschiedene AMV-RT-Konzentrationen 10fach bestimmt und der Extinktionsbereich vom Extinktionsmittelwert $\times E_{492nm} \pm 3SD$ ermittelt.

2.3. HIV-1-spezifischer RT-Aktivitätstest

100 µl des geometrisch mit BrdUTP- und Template-Primer freien RT-Puffer verdünnten Viruslysats werden in die mit dem anti-HIV-1-RT-Antikörper beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte dosiert und 30-90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung abgesaugt, und nicht gebundene Bestandteile werden durch dreimaliges Spülen der Kavitäten mit Waschlösung entfernt. Für die nachfolgende enzymatische RT-Reaktion werden 100 µl RT-Puffer (siehe Allgemeiner RT-Aktivitätstest, Beispiel 1) in die Kavitäten dosiert und 90 min bei 37°C inkubiert. Von diesem Schritt an verläuft der Test weiter wie unter Allgemeiner RT-Aktivitätstest, Beispiel 2.1., beschrieben.

Zur Spezifitätskontrolle des Tests gegenüber HIV-1 assoziierter RT wurde AMV-RT, eingestellt auf eine Volumenaktivität von 50 Einheiten (U)/ml, geometrisch bis zu einer Aktivität von 0,09 U/ml verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Verdünnungen wurden in die mit Anti-HIV-1-RT-Antikörpern beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatten dosiert und 90 min bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der Lösung und dreimaligem Spülen der Kavitäten mit Waschlösung wird der Test, wie unter Beispiel 2.1. beschrieben, weitergeführt.

3. Ergebnisse

Zu Beispiel 2.1.: HIV-RT läßt sich unter der im Beispiel 2.1. beschriebenen Methode bis zu einer Aktivität von 0,20 U/ml nachweisen (Abb. 2).

Zu Beispiel 2.2.: Die untere Nachweisgrenze für AMV-RT liegt bei 0,03 U/ml. Die Extinktionen im Immunoassay zum Nachweis von Poly-BrdUTP verhalten sich über den Bereich von 0,02 bis 0,2 U/ml RT linear zur eingesetzten RT-Aktivität (Abb. 1). Die analytische Empfindlichkeit bei der Erfassung der geringsten Differenz zweier unterschiedlicher RT-Konzentrationen beträgt 0,01 U/ml (Abb. 1).

Zu Beispiel 2.3.: Der HIV-Aktivitätsnachweis ist um den Faktor 5-10 empfindlicher als der Nachweis der RT-Aktivität des gleichen Präparates im Allgemeinen RT-Aktivitätstest, bedingt durch Entfernung von hemmenden Substanzen (PEG) vor der RT-Reaktion (Abb. 2). AMV-RT-Aktivität läßt sich in diesem Test nicht nachweisen, da sie über den anti-HIV-1-RT-Antikörper nicht gebunden und demzufolge durch die nachfolgende BF-Trennung vor der RT-Enzymreaktion aus dem Reaktionsgefäß entfernt wurde (Abb. 2).