

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Teilweise bestätigt gemäß § 18 Absatz 1
Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **214 695 B1**

4(51) G 01 N 33/564
G 01 N 33/552

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP G 01 N / 249 992 5	(22)	19.04.83	(45)	03.06.87
				(44)	17.10.84

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Schößler, Werner, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Dittrich, Christa, DD

(54) **Festphasen-Immunoassay zur Bestimmung von zirkulierenden Immunkomplexen**

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Festphasen-Immunoassay zur Bestimmung von zirkulierenden Immunkomplexen durch Bindung an C1q auf der Grundlage siliciumdioxidhaltiger Materialien, **dadurch gekennzeichnet**, daß als feste Phase Formkörper mit glatter Oberfläche und gegebenenfalls mit guter Lichtdurchlässigkeit eingesetzt werden, die nach vorheriger, an sich bekannter chemischer Oberflächenmodifizierung mit Silanhaftmitteln und hetero- und homobifunktionellen Reagenzien mit dem Protein C1q beladen werden und daß nach Spaltung der Bindung zwischen C1q und den aufgetragenen Immunreaktanten durch nicht denaturierende Medien wie gepufferte Lösungen, die 0,5 bis 3m NaCl enthalten, die mit C1q beladenen Formkörper wieder im Immunoassay eingesetzt werden.
2. Festphasen-Immunoassay nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die im Immunoassay als feste Phase eingesetzten Formkörper kugelförmige, planare, zylinderförmige, würfelförmige und kegelförmige Gestalt haben, daß sie sowohl kompakt- als auch Hohlkörper sind, daß die Hohlkörper offen oder geschlossen sind und daß das Volumen der Formkörper $0,1\text{ cm}^3$ bis 15 cm^3 beträgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft einen Festphasen-Immunoassay zur kovalenten Bindung von Proteinen an siliciumdioxidhaltige Formkörper, vorzugsweise aus Glas, und deren wiederholten Einsatz im (Enzym-)Immunoassay zum empfindlichen und spezifischen Nachweis von Antigenen, Antikörpern, Viren etc., insbesondere von zirkulierenden Immunkomplexen. Der Assay findet Anwendung in der pharmazeutischen Industrie, der Medizin, in der biowissenschaftlichen Forschung sowie der Biotechnologie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Anwendung von Immunoassays zur spezifischen und sensitiven Bestimmung von Haptenen, Antigenen und Antikörpern hat in den letzten Jahren sowohl in der klinischen Routinediagnostik als auch der biowissenschaftlichen Forschung große Bedeutung erlangt. Am häufigsten angewandt wird hierbei die Festphasen-Technik („solid-phase“-Technik), bei der einer der immunologischen Reaktionspartner an eine feste Phase gebunden ist und somit eine leichte Trennung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe von den freien, ungebundenen Reaktionspartnern möglich ist. Hierbei fand das auf K.J. Catt und G.W. Tregear (Science **158** [1967] 1570) zurückgehende Verfahren der adsorptiven Bindung von Proteinen an feste Kunststoffphasen (Polystyrol, Polyäthylen, PVC u. a.) eine weitere Verbreitung (Übersicht: J.E. Herrmann in: Methode in Enzymology **73** [1981] S. 239).

Nachteile dieses Verfahrens sind:

- Die Beladungsdichte an den Plastmaterialien und damit die Empfindlichkeit des Immunoassays werden durch das jeweilige Kunststoffmaterial und die zur Verfügung stehende Oberfläche limitiert.
- Während der einzelnen Inkubations- und Waschvorgänge im Immunoassay werden erhebliche Proteinmengen (68% bei Virusantigenen: J.E. Herrmann, R.M. Hendry, M.F. Collins: J. Clin. Microbiol. **10** [1979] 210; 50% bei Antikörpern: W. Schöblier, G. Wegner: Z. med. Labordiagn. im Druck) desorbiert. Derartige Desorptionen beeinflussen wiederum die Empfindlichkeit ungünstig und bestimmen entscheidend den Fehler der Methode.
- Die mit Proteinen beladenen Plastmaterialien können nach Ablauf der Immunreaktion nur einmal verwendet werden, so daß sehr wertvolle und nur aufwendig zu präparierende Proteine verloren gehen.
- Die Verwendung dieser Plastmaterialien als Einweggefäße stellt bei größeren Probenzahlen in der klinischen Routine einen nicht unerheblichen ökonomischen Faktor dar.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, beschrieben verschiedene Autoren den Einsatz chemisch modifizierter (Plaste-)Materialien zur kovalenten Kopplung von Proteinen im Immunoassay (Übersicht: J.E. Herrmann in: Methods in Enzymology **73** [1981] S. 239). Von derartigen Materialien haben insbesondere Zellulose, Dextrane, Agar und dessen Derivate neben Polyacrylsäure-Derivaten, substituierten Polystyrolen oder Nylon als Matrix Anwendung gefunden. Diese Materialien haben sich jedoch nicht in dem gewünschten Umfang durchsetzen können, einmal, da die chemischen Modifizierungen mit einem erheblichen Aufwand verbunden sind und zum anderen, da diese Materialien Proteine unspezifisch binden, thermisch und chemisch relativ instabil sind oder mikrobiell leicht angegriffen werden.

Es ist seit einigen Jahren bekannt, daß die OH-Gruppen auf SiO_2 -Oberflächen als individuelle Zentren für chemische Reaktionen zur Verfügung stehen. Zu den bedeutsamsten Reaktionen gehört hierbei die Umsetzung mit Organosilanen, die unterschiedliche funktionelle Gruppen besitzen. Während die silikofunktionelle Gruppe in Anwesenheit von Wasser auf Glasoberflächen (oder ähnlichen Stoffen) gebunden wird, steht die organofunktionelle Gruppe den üblichen chemischen Reaktionen unter Verwendung von Amino-, Carbonyl-, Carboxy-, Isocyano-, Diazo-, Isothiocyano-, Sulfhydryl- oder Nitroso-Gruppen zur Verfügung, so daß diese siliciumorganischen Verbindungen als Brücke zwischen dem anorganischen Material und der organischen/biochemischen Verbindung fungieren. Auf diese Art und Weise wurde die kovalente Bindung von Enzymen (R.A. Messing, H.H. Weetall: US-Pat. 3519538; R.E. Miller: US-Pat. 3669841) sowie Antigenen und Antikörpern (H.H. Weetall, N.Y. Elmira: US-Pat. 3652761) beschrieben. Diese Präparate wurden ausschließlich als immobilisierte Enzyme für präparative und analytische Zwecke sowie als immobilisierte Antigene/Antikörper für Affinitätschromatographische Zwecke eingesetzt.

(s. hierzu auch: F. Janowski, W. Heyer: Poröse Gläser, Dt. Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1982). In dem US-Patent 3975511 beschrieben W. P. Vann und S. Yaverbaum die Kopplung von Antikörpern an poröses Glas und deren Einsatz im Radioimmunoassay zur Bestimmung von Digoxin, Insulin und Östriol. Dieses Verfahren hat zwei entscheidende Nachteile, die eine breite Anwendung in der Praxis stark einschränken, wenn nicht gar unmöglich machen. Die Verwendung von porösen Gläsern mit Partikelgrößen zwischen 0,05 und 12 µm und einer mittleren Porenweite zwischen 30 Å und 1200 Å garantiert zwar eine große Oberfläche, führt aber andererseits zu erheblichen unspezifischen Reaktionen, da Serumproteine fast ausnahmslos in diese Poren eindringen und auf Grund des Molekularsiebeffektes der porösen Gläser nur mit großem Aufwand vollständig ausgewaschen werden können. Weiterhin bedingt die Verwendung von porösen Gläsern aufwendige und ausgedehnte Zentrifugationsschritte zur Separation der gebundenen Reaktionspartner von den freien sowie zwischen den einzelnen Waschvorgängen. Dieser Aufwand steht einer rationellen Bestimmung großer Probenzahlen in der klinischen Routine entgegen und schränkt die Möglichkeiten einer (halb)automatischen Bestimmung sehr stark ein. Hinzu kommt, daß die Wiederverwendung der auf diese Art und Weise gebundenen Antikörper durch Spaltung der gebildeten Immunkomplexe nach Ablauf der Immunreaktion mit porösen Gläsern aus den beschriebenen Gründen nicht praktikabel erscheint und bisher noch nicht beschrieben ist. Die Bildung von Immunkomplexen stellt einen physiologischen Abwehrmechanismus zur raschen Eliminierung endogener und exogener Antigene im Körper dar. Bei einer Vielzahl von Erkrankungen sind die zirkulierenden Immunkomplexe jedoch in erhöhten Konzentrationen im Serum nachweisbar und können pathologische Folgereaktionen auslösen (s. hierzu A. N. Theofilopoulos, F. J. Dixon: Adv. Immunol. **28** [1979] 89). Deshalb erlangt die Bestimmung zirkulierender Immunkomplexe in der klinischen Praxis zunehmende Bedeutung (S. E. Ritzmann, J. C. Daniels: Clin. Chem. **28** [1982] 1259). Zu den allgemein als spezifisch anerkannten Methoden gehören solche, die Immunkomplexe auf Grund ihrer Fähigkeit, C1q — eine Untereinheit der ersten Komplementkomponente — zu binden, nachweisen. Die hierzu beschriebenen C1q-Festphasen-Immunoassays arbeiten ausschließlich mit an Polystyrol adsorptiv gebundenem C1q (R. H. Zubler et al.: J. Immunol. **116** [1976] 232; D. A. Pohl et al.: J. immunol. methods **40** [1981] 313; Ch. Wehler et al.: Mol. Immunol. **18** [1981] 157; W. Schößler et al. Biomed. Biochim. Acta im Druck), welches aus den beschriebenen Gründen nur einmal eingesetzt werden kann.

Ziel der Erfindung

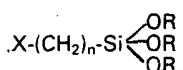
Es ist das Ziel der Erfindung, einen Festphasen-Immunoassay zur Bestimmung zirkulierender Immunkomplexe zu schaffen, bei dem allgemein zugängliche und billige Trägermaterialien eingesetzt werden, die sich praktisch nach Durchführung der Bestimmung einfach und schnell zwecks Wiederverwendung regenerieren lassen. Weiterhin wird angestrebt, hierdurch sowohl die Ökonomie als auch die Genauigkeit des Assays entscheidend zu verbessern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, einen Festphasen-Immunoassay auf der Grundlage von siliciumdioxidhaltigem Material, das auf an sich bekannte Weise mit Silanhaftmitteln oberflächenmodifiziert wurde, für die Bestimmung von zirkulierenden Immunkomplexen zu schaffen.

Die Aufgabe wird durch ein Festphasen-Immunoassay zur Bestimmung von zirkulierenden Immunkomplexen gelöst. Der erfindungsgemäße Assay ist dadurch gekennzeichnet, daß als feste Phase unlösliche siliziumdioxidhaltige Formkörper eingesetzt werden, die nach an sich bekannter vorheriger chemischer Oberflächenmodifizierung mit Silanhaftmitteln und hetero- oder homobifunktionelle Reagenzien mit dem Protein C1q beladen werden und daß nach Spaltung der Bindung zwischen C1q und den aufgetragenen Immunreaktanten durch nicht denaturierende Medien die mit C1q beladenen Formkörper wieder im Immunoassay eingesetzt werden. Die als feste Phase verwendeten Formkörper haben eine unterschiedliche geometrische Form.

Besonders geeignet sind kugelförmige, planare oder zylindrische Körper, aber auch würfelförmige oder kegelförmige lassen sich verwenden. Das Volumen der Körper beträgt mindestens 0,1 cm³ und sollte 15 cm³ nicht überschreiten. Die Formkörper sind kompakt oder hohl, wobei Hohlräume geschlossen oder offen sind. Das siliziumdioxidhaltige Material ist im wesentlichen Glas, wobei die Zusammensetzung unterschiedlich sein kann. Es muß nur gewährleistet sein, daß sich genügend Si-OH-Gruppen auf der Oberfläche befinden. Die nicht denaturierenden Medien für die Spaltung der Bindung zwischen C1q und den Immunreaktanten setzen sich aus gepufferten Lösungen, die zwischen 0,5 M bis 3 M NaCl enthalten, zusammen. Die Oberflächenmodifizierung zum Zwecke der Schaffung von Bedingungen für das Eingehen kovalenter Bindungen mit dem Protein C1q erfolgt durch sogenannte Silanhaftmittel wie



wobei R Alkylreste und X Aminogruppen, Diazogruppen u. ä. sind, und durch Umsetzen der verbleibenden Aminogruppe mit hetero- oder homobifunktionellen Reagenzien wie Glutaraldehyd. An die so aktivierte Glasoberfläche wird erfindungsgemäß das Protein C1q (eine Untereinheit der ersten Komplementkomponente) in der bekannten Art und Weise gebunden.

Wichtig ist hierbei, daß die erfindungsgemäß zu verwendenden Glaskörper leicht zu handhaben sind und eine hinreichend große Oberfläche besitzen.

Die so mit dem Protein C1q beladene Glasmatrix wird dann als feste Phase im (Enzym-)Immunoassay eingesetzt. Nach Ablauf der Immunreaktion werden die gebundenen Immunreaktanten durch geeignete, nicht denaturierende Medien wie 1 M NaCl-Lösung abgespalten, so daß das kovalent gebundene C1q für einen erneuten Einsatz im Immunoassay zur Verfügung steht. Der erfindungsgemäße Immunoassay zeichnet sich durch eine Reihe von Vorteilen aus:

- Durch die kovalente Bindung von C1q an Glasoberflächen lassen sich höhere Beladungsschichten erzielen. Diese führen ebenso wie die verbesserte sterische Zugänglichkeit des Proteins — bedingt durch den Spacer — zu einer höheren Empfindlichkeit im Immunoassay.

- Durch die Immobilisierung treten keine Desorptionen des Immunreaktanten während der Inkubations- und Waschvorgänge im Immunoassay auf. Dadurch wird der methodische Fehler erheblich reduziert.
 - Die unspezifische Bindung an den Glas-Formkörpern ist vernachlässigbar gering.
 - Der erfindungsgemäße Immunoassay führt zu einer erheblichen Reduzierung der Kosten in der klinischen Praxis. Einmal, da die als Einweggefäße benutzten Plastematerialien abgelöst werden und zum anderen, da sich dieser Immunoassay durch Wegfall aufwendiger Zentrifugationsschritte leicht automatisieren läßt.
 - Durch die kovalente Bindung des Proteins C 1 q an die Glasoberfläche kann dieses unter Anwendung nicht denaturierender Medien wiederholt im Immunoassay eingesetzt werden. Dadurch wird das nur aufwendig zu präparierende Protein eingespart, was wiederum die Kosten des Assays günstig beeinflusst.
- Im folgenden wird die Erfindung durch einige Beispiele erläutert.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

In kommerzielle Glasröhrchen (10 mm × 40 mm) werden je 500 µl einer 1%igen Lösung des Silanhaftmittels NB 1114 (Aminopropyltriäthoxysilan, VEB Chemiewerk Nünchritz) in Äthanol/Wasser (1:1) gegeben und 4 Stunden bei höheren Temperaturen (37°C–60°C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer, pH 7,4, werden je 500 µl 2%iges Glutaraldehyd in PBS-Puffer zugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen werden die so aktivierten Röhrchen mit je 500 µl C 1 q in PBS-Puffer versetzt und 4 h bei Raumtemperatur bebrütet. Nach weiteren Waschvorgängen werden die eventuell noch freien Aldehydgruppen mit 0,2 m Lysinlösung blockiert. Nach wiederholtem Waschen mit 0,01 m Phosphatpuffer, pH 7,4, der 0,05 m NaCl, 0,05% Tween 20 und 0,01% NaN₃ enthält, erfolgt die Ausführung des Enzymimmunoassays (EIA) in der üblichen Art und Weise.

C 1 q, eine Untereinheit der ersten Komplementkomponente, bindet zirkulierende Immunkomplexe bzw. aggregiertes IgG in vivo und in vitro. Zur Erstellung der Eichkurve werden geeignete Verdünnungen (7,8 ng/ml bis 7,8 µg/ml) an aggregiertem IgG mit 0,01 m Phosphatpuffer, pH 7,4, der 0,05 m NaCl, 1,5% Tween 20 und 0,02% NaN₃ enthält, hergestellt. Die zu bestimmenden humanen Seren werden zunächst mit 0,2 m EDTA 1:3 und nachfolgend mit gleichem Verdünnungspuffer derart verdünnt, daß eine Endverdünnung von 1:100 resultiert. Jeweils 0,5 ml dieser Serumverdünnungen bzw. der Standardverdünnungen werden in die beladenen Glasröhrchen überführt und 4 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit oben genanntem Waschpuffer werden 0,5 ml eines Konjugats, bestehend aus einem Kaninchen-anti-human-IgG-Antikörper und alkalischer Phosphatase, in einer Konzentration von 15 ng/ml zugegeben und 4 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wird die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase durch Hydrolyse von 4-Nitrophenylphosphat in 1 ml Diäthanolaminpuffer pH 9,8 und photometrische Messung des Enzymproduktes bei 405 nm nach Stoppen mit 1 m NaOH bestimmt (W. Schöblier et al. Biomed. Biochim. Acta, im Druck).

Nach Ausführung des Enzymimmunoassays (EIA) werden die Röhrchen zweimal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und mit je 1 ml PBS-Puffer, der 1 m NaCl enthält, inkubiert und 2 h bei 37°C stehengelassen. Dadurch wird die Bindung zirkulierender Immunkomplexe bzw. von aggregiertem IgG an C 1 q unterbrochen, so daß die mit C 1 q beladenen Röhrchen wieder im EIA eingesetzt werden können.

Beispiel 2

Glaskugeln von 5,5 mm Durchmesser (mattiert, F ~ 50 mm²) werden, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit dem Silanhaftmittel NB 1115 (Glycidoxypropyltriäthoxysilan, VEB Chemiewerk Nünchritz) behandelt und anschließend mit Glutaraldehyd aktiviert und mit C 1 q gebunden. Zur Ausführung des EIA werden die Glaskugeln in kommerzielle Mikrotiterplatten, die 96 Proben á 300 µl aufnehmen, gegeben und im folgenden mit je 200 µl Lösung an aggregiertem IgG bzw. Humanserum entsprechendes Beispiel 1 versetzt. Die Reihenfolge der einzelnen Schritte erfolgt analog Beispiel 1, wobei die Waschvorgänge dadurch erfolgen, daß hierzu nach Versetzen mit je 200 µl Waschpuffer die Mikrotiterplatte abgedeckt wird und durch einfaches Umdrehen entleert wird. Dadurch vereinfacht sich der Waschprozeß im Vergleich zu Beispiel 1, bei dem jedes Röhrchen in der üblichen Art und Weise mittels Vakuum abgesaugt werden muß, erheblich. Nach Inkubation mit dem Konjugat und Versetzen mit dem Substrat wird die Enzymaktivität durch Absaugen des gebildeten Farbstoffes mit einer Absaugküvette (VEB Carl Zeiss Jena) bestimmt. Entsprechend Beispiel 1 werden die gebundenen Immunkomplexe sowie das Konjugat mit PBS-Puffer, pH 7,4, der 10 mM EDTA und 1 m NaCl enthält, abgespalten und eluiert, so daß die Glaskugeln erneut im EIA eingesetzt werden können.

Beispiel 3

Zylinderförmige Formkörper aus Glas (Außendurchmesser 6 mm, Innendurchmesser ca. 4 mm, Höhe ca. 3 mm) werden, wie in Beispiel 1 oder 2 beschrieben, mit Silanhaftmitteln, Glutaraldehyd und C 1 q aktiviert und beladen. Diese Glas-Formkörper werden in Polystyrol-Mikrotiter-Platten eingeführt und im folgenden der EIA in der beschriebenen Art und Weise ausgeführt. Die Waschvorgänge erfolgen auch hier durch einfaches Füllen der Probenvertiefungen mit Waschpuffer (oder Leitungswasser) und Umdrehen der abgedeckten Mikrotiterplatten. Nach erfolgter Enzymreaktion wird die Aktivität des Enzyms durch photometrische Bestimmung des Reaktionsproduktes senkrecht zu der glasklaren Mikrotiterplatte mit einem geeigneten Gerät bestimmt. Auch diese Formkörper werden wie im Beispiel 1 und 2 beschrieben durch Elution mit 1 m NaCl reaktiviert und wiederholt eingesetzt.