

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 65/93

(51) Int.Cl.⁶ : **G01N 33/563**
G01N 33/58, 33/566, 33/577, 33/569,
33/76, 33/576

(22) Anmeldetag: 18. 1.1993

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1996

(45) Ausgabetag: 25. 7.1997

(56) Entgegenhaltungen:

WD 89/06799A1 US 4659678A EP 0317001A1 US 4983529A
US 4253844A EP 0346119A2

(73) Patentinhaber:

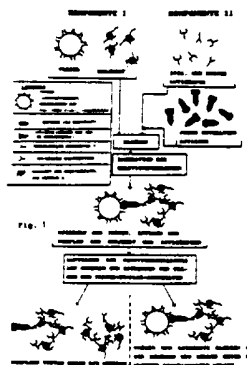
WALDHEIM PHARMAZEUTIKA GESELLSCHAFT M.B.H.
A-2491 NEUFELD A.D. LEITHA, BURGENLAND (AT).

(72) Erfinder:

SCHINKINGER MANFRED DR.
WIENER NEUSTADT, NIEDERÖSTERREICH (AT).
KORGER MARKUS DR.
WIEN (AT).

(54) VERFAHREN UND MITTEL ZUM NACHWEISEN VON ANTIGENEN

(57) Ein in einer Probe enthaltenes Antigen wird nachgewiesen, indem man die Probe in einem Reaktionsgemisch, das einen partikelförmigen Träger, an dem Fab- oder F(ab)₂-Fragmente eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen monoklonalen Antikörpers immobilisiert sind, und ein Konjugat, das aus wenigstens einem zum Fc-Fragment von Antikörpern reaktiven Protein und einem an dieses gebundenen Indikator besteht, sowie wenigstens einen bezüglich des nachzuweisenden Antigens spezifischen monoklonalen Antikörper enthält, inkubiert. Dabei bilden sich Aggregate aus partikelförmigem Träger, Antigen und Komplexen, bestehend aus Konjugat und Antikörpern. Das Reaktionsgemisch wird auf die Anwesenheit von das nachzuweisende Antigen enthaltenden Aggregaten geprüft.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweisen eines in einer Probe enthaltenen Antigens durch Binden des nachzuweisenden Antigens an ein Fab- oder F(ab)₂-Fragment eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen, monoklonalen Antikörpers.

Die Erfindung betrifft auch ein Mittel zum Nachweisen eines in einer Probe enthaltenen Antigens, das sich besonders für das Ausführen des erfindungsgemäßen Verfahrens eignet.

In der WO 89/06799 wird ein Analysengerät beschrieben, in dem eine aus vier Bestandteilen bestehendes Gemisch verwendet wird. Die Bestandteile sind der zu bestimmende Stoff, ein monoklonaler Antikörper, der mit dem nachzuweisenden Stoff eine Bindung eingehen kann, ein markiertes Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers, das ebenfalls mit dem zu untersuchenden Stoff eine Bindung eingehen kann, und ein Antikörper, der an eine feste Phase gebunden ist, der mit dem Fc-Teil eines monoklonalen Antikörpers, jedoch nicht mit seinem Fab-Teil eine Bindung eingehen kann. Beim Ausführen des Bestimmungsverfahrens und Verwendung des in dem Vorhalt beschriebenen Analysengerätes werden der zu untersuchende Stoff und die genannten Bestandteile des für die Analyse verwendeten Stoffkomplexes auf jeweils hierfür vorgesehene Stellen des Analysegerätes aufgebracht und dann nach einer bestimmten Vorschrift miteinander kontaktiert.

Bei dem in der US-PS-4 659 678 beschriebenen Bestimmungsverfahren wird in einer flüssigen Probe ein Komplex zwischen einem Antigen und wenigstens zwei Antikörpern gebildet, wobei dieser Komplex durch eine nicht kovalente Bindung an einen festen Träger gebunden wird. Es wird auch vorgeschlagen, durch Markierungsmittel das Ausmaß der Bindung des Komplexes an den festen, gegebenenfalls partikelförmigen Träger zu bestimmen. Bei diesem aus der US-PS-4 659 678 bekannten Verfahren wird so vorgegangen, daß aus dem Antigen und dem löslichen Antikörper vor Zugabe der festen Phase ein Komplex gebildet wird. Daraus ergibt sich eine zweistufige Arbeitsweise.

Bei der in der US-PS-4 659 678 beschriebene Arbeitsweise können nicht nachzuweisende Antigene und Antikörper die Größe der Komplexe nicht erhöhen.

Die EP-0 317 001 A beschreibt ein Nachweissystem, das auf ultrakleinen, kolloidalen Metallteilchen beruht. Die in der EP-0 317 001 A geoffenbarten Metallteilchen sollen eine Größe zwischen 0,8 und 2 nm, vorzugsweise zwischen 1 und 1,8 nm besitzen, also die Teilchen je 12 bis 600 Metallatome enthalten. Das bevorzugte Metall der EP-0 317 001 A ist Gold.

In der EP-0 317 001 A ist auch geoffenbart, daß diese kolloidalen Metallteilchen mit einem Bindemittel kombiniert werden, wobei als Bindemittel insbesondere Antikörper und/oder ihre Fragmente vorgesehen sein sollen.

Bei der in der EP-0 317 001 A beschriebenen Arbeitstechnik werden weder an einen partikelförmigen Träger gebundene Antigene noch irgendwelche Konjugate verwendet.

Die US-PS-4 983 529 beschreibt die Verwendung von F(ab')₂-Fragmenten als Sonde für die Bestimmung von HIV-1-Antigenen.

Die US-PS-4 253 844 befaßt sich mit einem Verfahren zum Herstellen insolubilisierter Antikörper, F(ab')₂-Fragmenten derselben und Proteinantigenen, indem sie an ein nicht in Wasser lösliches Substrat gebunden werden, wobei ein Brückenglied verwendet werden soll, das nicht kovalent an ein Schwefelatom im Antikörper, im Fragment oder in dem Protein eher bindet, als an eine freie Aminogruppe. Als Brückenglied wird beispielsweise eine Verbindung mit einer endständigen Chloracetyl-Gruppe vorgeschlagen. Die so insolubilisierten Antikörper sollen in Analysenverfahren verwendet werden können.

Nähere Angaben über die mit den gemäß dem Vorhalt hergestellten insolubilisierten Proteinen u.s.w. sind, welche mit den erfindungsgemäßen Schritten vergleichbar sind, sind in dem Vorhalt nicht beschrieben.

In der EP-A-346 119 wird ein Assay für das Bestimmen von Antikörpern beschrieben, bei dem die Antikörper, die zu bestimmen sind, an ihrer Fc-Region gebunden werden. Bei diesem Verfahren soll durch Fc-spezifische Mittel der zu bestimmende Antikörper an seinem Fc-Bereich gebunden werden. Der so gebundene Antikörper wird mit einem bezüglich des Antikörpers reaktiven Antigen in Berührung gebracht und dann die Gegenwart des Antikörpers bestimmt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Nachweisverfahren der eingangs genannten Gattung zur Verfügung zu stellen, das einfach und zuverlässig ist und in einem Schritt ausführbar ist.

Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe in einem Reaktionsgemisch, das einen partikelförmigen Träger, an dem Fab- oder F(ab)₂-Fragmente eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen monoklonalen Antikörpers immobilisiert sind, und ein Konjugat, das aus wenigstens einem zum Fc-Fragment von Antikörpern reaktiven Protein und einem an dieses gebundenen Indikator besteht, sowie wenigstens einen bezüglich des nachzuweisenden Antigens spezifischen monoklonalen Antikörper enthält, inkubiert, um Aggregate aus partikelförmigem Träger, dem nachzuweisenden Antigen und Komplexen bestehend aus Konjugat und Antikörpern zu bilden, und daß man dann auf die

Anwesenheit von Aggregaten prüft, die das nachzuweisende Antigen enthalten.

Ein erheblicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß sowohl die Reaktion zwischen Konjugat, Antikörper und dem Antigen oder den Antigenen als auch das Binden der dabei gebildeten, das nachzuweisende Antigen enthaltenden Komplexe gleichzeitig und in einem einzigen Reaktionsmilieu vor sich geht.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist u.a. deswegen besonders einfach ausführbar, weil es keine zusätzlichen immunochemischen Reaktionen zur Detektion des Antigens erfordert.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß auch Antigene bzw. Antikörper, die in der Probe enthalten, aber nicht nachzuweisen sind, die Größe der Komplexe und damit die der Aggregate aus Komplex und Träger erhöhen, so daß nach dem Abtrennen leichter und mit größerer Sicherheit festgestellt werden kann, ob eine positive Reaktion (= Binden von das nachzuweisende Antigen enthaltenden Komplexen am Träger) aufgetreten ist.

Zum Nachweis von Antigenen verwendbare Mittel sind gemäß der Erfindung dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel aus einer Komponente I und einer Komponente II besteht, daß die Komponente I einen partikelförmigen Träger, der mit Fab- oder F(ab)₂-Fragmenten eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen Antikörpers beschichtet ist, und ein Konjugat enthält, das aus wenigstens einem zum Fc-Fragment von Antikörpern reaktiven Protein und einem Indikator besteht, daß die Komponente II für das nachzuweisende Antigen spezifische, monoklonale Antikörper und gegebenenfalls bezüglich des nachzuweisenden Antigens unspezifische IgG-Moleküle bzw. deren Fc-Fragmente enthält.

Diese Mittel können einfach hergestellt werden.

Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens und Mittel sind Gegenstand der Unteransprüche.

Die Entwicklung der klinischen Labordiagnostik schreitet weltweit stark voran und hat damit einen steigenden Bedarf an hochsensitiven, sehr spezifischen und rasch durchzuführenden Testsystemen.

Im Gegensatz zur klinisch-chemischen Massendiagnostik ist vor allem die immunologische und serologische Diagnostik darauf angewiesen, in kleineren Serien und mit möglichst minimaler Laborausstattung zu arbeiten. Daher zeigt sich hier ein Trend zu geräteunabhängigen Schnelltests.

Im wesentlichen sind derzeit drei Grundsysteme in verschiedenen Varianten verfügbar:

1. Partikelagglutination
2. Immunokonzentration
3. Radial Partition Immunoassay (RPIA).

1. Partikelagglutination

Mit Antigen oder Antikörper beschichtete Partikel (meist Latexpartikel oder Erythrozyten) werden durch eine Immunreaktion zur makroskopisch sichtbaren Agglutination gebracht (direkte Partikelagglutination) oder in der Agglutination gehindert (indirekte oder kompetitive Partikelagglutination).

Diese Testsysteme sind schnell und bedürfen nur einer minimalen Laborausstattung, sind jedoch häufig zu wenig sensitiv und spezifisch und brauchen meist für ihre Auswertung eine gewisse Erfahrung. Darüber hinaus sind sie meist sehr anfällig für störende Einflüsse von Serumkomponenten (Lipide, Rheumafaktoren und dergl.).

2. Immunokonzentration

Bei diesen Systemen werden Antigene oder Antikörper auf definierten Bereichen einer Membran immobilisiert und Probe- und Nachweisreagenzien werden aktiv (über Vakuum) oder passiv (durch Kapillarkwirkung) durchgesaugt. (ICONR von Hybritech, US Patent Nr. 4.727.109 und 4.632.901). Durch diese Gestaltung der Festphase wird die Kinetik der Antigen-Antikörperinteraktion um den Faktor 10 beschleunigt, sodaß zeitraubende Inkubationsschritte entfallen. Die Detektion erfolgt wie beim Sandwich-ELISA mit enzymmarkierten Sekundärantikörpern und der anschließenden Visualisierung der Enzymreaktion. Es handelt sich dabei um ein mehrstufiges Verfahren, das in 5 bis 10 Minuten Ergebnisse liefert, die in Sensitivität und Spezifität durchaus mit ELISA-Ergebnissen vergleichbar sind.

Neuer Entwicklungen befassen sich auch mit der Verwendung von Latexpartikeln als Antigenträger und deren anschließende Immobilisierung auf diversen Membranen anstatt der Membran-Direktbeschichtungsmethode.

3. Radial Partition Immunoassay (RPIA)

Diese Technologie vereint die Prinzipien der "solid phase" Immuntechnik mit der radialen Chromatographie. Beim RPIA werden Probe und markiertes Konjugat auf einer festen Matrix (Membran), die immobilisiertes Antigen oder Antikörper enthält inkubiert. Nach einer geeigneten Inkubationszeit (wenige Minuten) werden die Reaktanten durch einen Waschschrift mittels radialer Chromatographie getrennt. Der zentrale Spot enthält dann nur mehr das Antigen, gebundene Antikörper und gebundenes Konjugat. Nicht gebundenes Konjugat und Serum bzw. Probenbestandteile diffundieren aus dem Kernbereich der Membran. Die Detektion erfolgt bei der Verwendung von enzymmarkierten Konjugaten durch anschließende Substratzugabe und Visualisierung der Enzymreaktion. Eine Abbildung möglicher Assayformate RPIA (radial partition enzyme immunoassay) befindet sich in der Anlage.

Neuere Tests, basierend auf diesem Prinzip, verwenden als Konjugat Gold markierte Sekundärantikörper, sodaß die Substratzugabe entfällt. Die Vorteile dieser Technologie liegen in der Einfachheit und Schnelligkeit der Durchführung. Unscharfe oder ungenügende Separation der Liganden führt in derartigen Systemen aber immer wieder zu Spezifitätsproblemen oder zu erhöhten Hintergrundreaktionen bei Verwendung enzymgekoppelter Systeme. Außerdem leidet auch die Sensitivität mitunter bei Verwendung der radialen Chromatographie, da vor allem zum Zeitpunkt der Benetzung der Membran (bei Probenauftrag) Reaktanten durch Kapillareffekte aus der Reaktionszone diffundieren können, bevor noch die Immunreaktion stattfinden konnte. Besonders bei Proben mit niedrigem Reaktantengehalt (z.B. schwachtitrige Seren) kann dieser Effekt zu Problemen führen.

Erfindungsgemäßes System (OSPICT)

Das vorliegende, neue Verfahren (OSPICT = One Step Particle Immuno-Concentration Technology) zeichnet sich dadurch aus, daß es in einem Schritt alle nötigen Reaktanten zur Reaktion bringt und durch die nachfolgende einfache Separation (z.B. Filtration durch eine Membran) einen optisch frei sichtbaren, hoch sensitiven Antigennachweis gestattet.

Ein Merkmal dieses Verfahrens liegt zum einen in der Verwendung eines Fc-reaktiven Proteins - konjugiert mit verschiedenen Indikatoren wie Gold, Pigmente, FITC, gefärbte Kunststoffpartikel etc. wie beispielsweise Protein A-Gold Konjugat, Protein-G-Gold Konjugat, Anti-Antikörper Gold Konjugat, Protein A FITC, Protein A + G Farblatex Konjugat, Komplementfaktoren etc. - zur Detektion der Antigen- Fab - oder F-(ab)₂-Fragment-Bindung auf den Latexpartikeln. Protein A und Protein G sind beispielsweise relativ kleine Proteine, die spezifisch am Fc-Fragment von IgG-Molekülen binden. Der Antikörper wird auch nach der Bindung an Protein A oder Protein G nicht in seiner Antigenbindungskapazität beeinflusst, sodaß eine simultane Inkubation beider Reaktanten in flüssiger Phase möglich wird.

Weiters ist für das Verfahren der Erfindung die simultane Inkubation von Detektorreagenz und der zu untersuchenden Probe von zentraler Bedeutung, da im erfindungsgemäßen System auch unspezifische IgG Moleküle zur Signalverstärkung genutzt werden. Da auf einem einzigen Goldpartikel bis zu 70 Moleküle Protein A oder Protein G gebunden sind, können diese bis zu 140 IgG Moleküle binden, die ihrerseits wiederum an auf anderen Goldpartikeln gebundenen Protein A oder -G Moleküle binden können. Die dabei entstehenden Komplexe können dann, auch wenn nur ein einziger Antikörper aus dem Komplex ein spezifischer Antikörper ist, von den Latexpartikeln spezifisch gebunden und anschließend auf der Membran zurückgehalten werden. Das Signal wird dabei durch das Mitnehmen der nicht antigenspezifischen Antikörpern um ein Vielfaches verstärkt.

Sämtliche immunologische Reaktionen (Antigen-Fab- bzw. F(ab)₂-Fragment-Bindung und Detektion) erfolgen bei diesem System gleichzeitig und innerhalb von 60 Sekunden. Im darauffolgenden Filtrations-schritt erfolgt die vollständige Abtrennung überflüssiger Reaktanten. Unspezifische Reaktionen werden in einem einzigen Waschschrift in Anschluß an die Filtration eliminiert. Das Ergebnis ist sofort, also ohne Substratzugabe, sichtbar und es bedarf auch keines Abstoppens irgendwelcher Enzymreaktionen. Durch die wenigen und sehr einfach durchzuführenden Reaktionsschritte werden darüberhinaus Fehlerquellen bei der Testdurchführung weitestgehend eliminiert.

Die Verwendung von Latexpartikeln als Träger für die Fab- oder F(ab)₂-Fragmente in flüssiger Phase ermöglichen eine optimale Beschleunigung der Kinetik der Antigen-Antikörper-Reaktion, da durch die Suspension der Latexpartikel diffusionsbedingte Prozeßlimitationen vermieden werden. Zusätzlich beschleunigt wird diese Reaktion durch die durch die Gravitation bedingte Sedimentation der Latexpartikel während der Inkubation, sodaß eine permanente Bewegung (Schütteln) des Testansatzes entfallen kann.

Die Testdurchführung ist äußerst einfach und besteht lediglich aus einer zu untersuchenden Vorgabelösung (z.B. Serumverdünnung), Zugabe dieser zu der einen Komponente des Mittels mit nachfolgender

Zugabe der zweiten Komponente, Überführen des Reaktionsgemisches auf die Filtervorrichtung und nach erfolgter Filtration Zugabe von 5 Tropfen Waschlösung (zum Wegwaschen überflüssiger Reaktanden). Eine Zubereiten der Reagenzien entfällt. Der Zeitbedarf für den vollständigen Nachweis beträgt höchstens 3 Minuten. Der Prozeß eignet sich sowohl zur Durchführung von Einzeltests als auch für die Testung größerer
 5 bis großer Serien, da eine Automatisierung unter Verwendung der gängigsten ELISA-Prozessoren sehr leicht möglich ist.

In den angeschlossenen Zeichnungen ist in Fig. 1 das erfindungsgemäße Nachweisverfahren und in Fig. 2 die Herstellung von Fab-, F(ab)₂- und Fc-Fragmenten schematisch dargestellt.

Bei dem Verfahren und dem Testsystem für die Bestimmung von Antigenen werden auf den Latexpartikeln Fab- oder F(ab)₂-Fragmente eines für das zu detektierende Antigen spezifischen monoklonalen Antikörpers (Antikörper 1) immobilisiert (vgl. Fig. 1). Zusätzlich wird im Reaktionsgemisch ein weiterer monoklonaler Antikörper vorgelegt, der sich in seiner Epitopspezifität vom immobilisierten Antikörper unterscheidet.

Bei dem Nachweis von Antigen(en) erfolgen sämtliche Reaktionsschritte simultan innerhalb von 60 Sekunden. Die Detektion erfolgt unter Verwendung von Fc-reaktiven Protein-Gold-, Protein-Farblatex- oder Protein-Farbpartikel-Konjugate (wie z.B. Protein-A-Gold, Protein-G-Gold, Protein A-Farblatex). Bei der Verwendung von IgG-hältigen Antigenproben (Serum, Plasma) werden unspezifische IgG-Moleküle zur Signalverstärkung genutzt. Nicht oder nur geringfügig IgG-hältige Antigenproben (Urin) können durch Zugabe von Fc-Fragmenten oder gereinigtem IgG zum Reaktionsgemisch ebenfalls von diesem Verstärkungsmechanismus profitieren.

20 Fc-, Fab- bzw. F(ab)₂-Fragmente von Immunglobulinen können durch Spaltung von IgG mit Papain (Fc und Fab) bzw. Pepsin (Fc und F(ab)₂) und anschließender chromatographischer Trennung der Fragmente erhalten werden (Fig. 2).

Für die Herstellung des Reaktionsgemisches ist zu beachten, daß dieses aus zwei Komponenten besteht, von denen unmittelbar vor Verwendung eine mit der Probe versetzt wird und das so erhaltene Gemisch mit der anderen Komponente gemischt wird. Idealerweise besteht eine Komponente (Komponente I) aus mit Fab-Fragmenten beschichteten Latexpartikeln mit dem Detektoreagenz (z.B. Protein-A-Gold) in einer physiologischen Pufferlösung, die andere Komponente (Komponente II) aus dem antigenspezifischen monoklonalen Antikörper und (gegebenenfalls) unspezifischen IgG-Molekülen bzw. deren Fc-Fragmenten ebenfalls in einer physiologischen Pufferlösung. Unspezifische IgG-Moleküle bzw. deren Fc-Fragmente
 30 kommen nur dann zur Anwendung, falls das System zum Nachweis von Antigenen in nicht IgG-hältigen Flüssigkeiten (Proben) verwendet wird.

Die Testdurchführung erfolgt dann wie folgt:

Zu einer Verdünnung der zu bestimmenden Antigenlösung wird zuerst Komponente II zugegeben und unmittelbar darauf mit Komponente I vermengt. Die weiteren Schritte sind Inkubieren, Filtration und das
 35 Auswerten.

Durch entsprechende Einstellung der einzelnen Testkomponenten kann jene Kombination ermittelt werden, bei deren Verwendung eine (lineare) Korrelation zwischen Signalintensität und Antigengehalt einer Probe besteht. Bei Verwendung von geeigneten Auswertesystemen (Dot-Scannern) wird bei gleichzeitiger Bestimmung von Antigen-Standardproben bekannter Konzentration auch eine quantitative Antigenbestimmung ermöglicht.
 40

Im einzelnen kann beim Nachweisverfahren gemäß der Erfindung beispielsweise wie folgt vorgegangen werden:

1.) Herstellen der Komponente I des Reaktionssystems:

45 Aus für das zu detektierende Antigen spezifischen, monoklonalen Antikörpern (Antikörper 1) werden entweder durch Papainspaltung Fab-Fragmente oder durch Pepsinspaltung F(ab)₂-Fragmente (siehe Fig. 2) hergestellt. Mit den so gewonnenen Fab- oder F(ab)₂-Fragmenten werden Träger, z.B. Latexpartikel (aus Polystyrol) mit einem Durchmesser von 1 µm beschichtet.

50 Weiters wird ein Konjugat aus Fc-reaktivem Protein (Protein A) und einem Indikator (z.B. Goldpartikel, FITC oder Farblatex) hergestellt (beispielsweise Protein-A-Gold-, Protein-G-Gold-, Protein-A-Farblatex-Konjugat).

Der beschichtete Träger und das Konjugat werden in eine Pufferlösung, insbesondere eine physiologische Pufferlösung eingetragen und die so gewonnene Komponente I für die Bestimmung vorrätig gehalten.

55

2.) Herstellen der Komponente II des Reaktionssystems:

Bezüglich des zu detektierenden Antigens spezifische, monoklonale Antikörper (Antikörper 2) und bezüglich des zu detektierenden Antigens unspezifische IgG-Moleküle (Antikörper) bzw. deren Fc-Fragmente werden ebenfalls in eine physiologische Pufferlösung eingetragen.

Unspezifische IgG-Moleküle bzw. deren Fc-Fragmente werden in die Komponente II nur eingebracht, wenn eine IgG-arme oder IgG-freie Probe (z.B. Urin), nicht aber eingebracht, wenn eine ohnedies IgG-haltige Antigenprobe (Serum, Plasma) untersucht wird.

3.) Durchführen des Nachweisverfahrens:

Unmittelbar vor dem Nachweis wird in die Komponente II die mit einer Pufferlösung, insbesondere mit einer physiologischen Pufferlösung, verdünnte Lösung von Antigenen (Probe, die allenfalls das nachzuweisende Antigen enthält) zugegeben. Dabei wird eine Komponente II mit unspezifischen IgG-Molekülen (Antikörpern) oder deren Fc-Fragmenten angewendet, wenn in der Antigen(e) enthaltenden Probe (z.B. Urin) wenig oder keine IgG-Moleküle enthalten sind.

Wenn eine IgG-haltige Probe (z.B. Plasma, Serum) dem Nachweisverfahren unterworfen wird, wird die mit Pufferlösung (physiologische Pufferlösung) verdünnte, zu bestimmende Antigenlösung in eine Komponente II eingetragen, die nicht mit unspezifischen IgG-Molekülen (Antikörpern) oder deren Fc-Fragmenten versetzt wurde. Dem so erhaltenen Gemisch wird die Komponente I zugegeben.

Das so erhaltene Reaktionsgemisch wird 30 bis 120 sek lang, vorzugsweise 60 sek lang bei einer Temperatur von 19 bis 30 °C inkubiert. Bei der Reaktion bilden sich Komplexe aus Konjugat und den entweder in Komponente II oder in der Probe enthaltenen Antikörpern (Antikörper 2 und IgG-Moleküle). Die Komplexe reagieren über die in ihnen enthaltenen, bezüglich des nachzuweisenden Antigens spezifischen Antikörper 2 mit dem Antigen. Das nachzuweisende Antigen bindet sich seinerseits an die Fab- oder F(ab)₂-Fragmente (des Antikörpers 1), mit welchen der Träger beschichtet ist. So entstehen Aggregate aus Träger, zu bestimmendem Antigen und Komplexen aus Konjugat und Antikörpern 2.

Nach dem Inkubieren wird über eine Membran (z.B. eine Nylonmembran) filtriert, wobei Komplexe ohne angelagerte Antigene und Komplexe mit angelagerten, nicht nachzuweisenden Antigenen durch die Membran hindurchtreten, wogegen die oben beschriebenen Aggregate, die nachzuweisende Antigene enthalten, auf der Membran zurückgehalten werden.

Im Anschluß an den Filtrationsvorgang wird mit einer Detergens-Pufferlösung gewaschen.

Das von den auf der Membran zurückgehaltenen Aggregaten gebildete Signal (Färbung, bei Verwendung von Goldpartikeln als Indikator eine Rotfärbung) dient als Signal für die Anwesenheit von nachzuweisendem Antigen, d.h. einem solchen, für welches das auf dem Träger immobilisierte Fab- oder F(ab)₂-Fragment spezifisch ist.

Durch gezielte Kombination von Komponente I und Komponente II liegt eine Korrelation zwischen Signalintensität und Antigengehalt der Probe vor. Es ist daher mit Hilfe von Auswertesystemen (Dot-Scannern) und gleichzeitiger Bestimmung von Antigenstandardproben bekannter Konzentration eine quantitative Antigenbestimmung möglich.

Beispiele:

Beispiel 1: Bestimmung von hCG im Urin oder Serum unter Verwendung von zwei monoklonalen anti-hCG Antikörpern zur Feststellung von Schwangerschaften oder für die Tumordiagnostik.

Beispiel 2: Bestimmung von HIV-1 p24 Antigenen unter Verwendung von zwei monoklonalen anti-p24 Antikörpern zum HIV-Antigennachweis.

Beispiel 3: Bestimmung von Hepatitis B-Antigenen im Serum oder im Plasma unter Verwendung von zwei monoklonalen anti-Hepatitis-B-Antikörpern.

Beispiel 4: Bestimmung von PMSG unter Verwendung von zwei monoklonalen anti-PMSG-Antikörpern zur Ermittlung der Trächtigkeit von Stuten.

Beispiel 5: Bestimmung von Mykotoxinen (Aflatoxin, Zearalenon ...) in Lebens- bzw. Futtermitteln unter Verwendung von jeweils zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern.

Beispiel 6: Bestimmung diverser Tumormarker (z.B. α -Fetoprotein) unter Verwendung von zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern.

Zusammenfassend kann die Erfindung beispielsweise wie folgt dargestellt werden: Ein in einer Probe enthaltenes Antigen kann durch Binden des nachzuweisenden Antigens an ein Fab- oder F(ab)₂-Fragment eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen, monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden.

Hiezu wird die Probe in einem Reaktionsgemisch, das einen partikelförmigen Träger, an dem Fab- oder F(ab)₂-Fragmente eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen monoklonalen Antikörpers immobilisiert sind, und ein Konjugat, das aus wenigstens einem zum Fc-Fragment von Antikörpern reaktiven Protein und einem an dieses gebundenen Indikator besteht, sowie wenigstens einen bezüglich des nachzuweisenden Antigens spezifischen monoklonalen Antikörper enthält, inkubiert. Dabei bilden sich Aggregate aus partikelförmigem Träger, dem nachzuweisenden Antigen und Komplexen bestehend aus Konjugat und Antikörpern. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und auf dem Filter auf die Anwesenheit (Farbreaktion) von das nachzuweisende Antigen enthaltenden Aggregaten geprüft.

Ein Mittel zum Nachweisen eines in einer Probe enthaltenen Antigens, das zur Anwendung beim Durchführen des Verfahrens geeignet ist, besteht aus einer Komponente I und einer Komponente II. Die Komponente I enthält einen partikelförmigen Träger, der mit Fab- oder F(ab)₂-Fragmenten eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen Antikörpers beschichtet ist, und ein Konjugat, das aus wenigstens einem zum Fc-Fragment von Antikörpern reaktiven Protein und einem Indikator besteht. Die Komponente II enthält für das nachzuweisende Antigen spezifische, monoklonale Antikörper und gegebenenfalls bezüglich des nachzuweisenden Antigens unspezifische IgG-Moleküle bzw. deren Fc-Fragmente.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweisen eines in einer Probe enthaltenen Antigens durch Binden des nachzuweisenden Antigens an ein Fab- oder F(ab)₂-Fragment eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen, monoklonalen Antikörpers, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Probe in einem Reaktionsgemisch, das einen partikelförmigen Träger, an dem Fab- oder F(ab)₂-Fragmente eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen monoklonalen Antikörpers immobilisiert sind, und ein Konjugat, das aus wenigstens einem zum Fc-Fragment von Antikörpern reaktiven Protein und einem an dieses gebundenen Indikator besteht, sowie wenigstens einen bezüglich des nachzuweisenden Antigens spezifischen monoklonalen Antikörper enthält, inkubiert, um Aggregate aus partikelförmigem Träger, dem nachzuweisenden Antigen und Komplexen, bestehend aus Konjugat und Antikörpern, zu bilden, und daß man dann auf die Anwesenheit von Aggregaten prüft, die das nachzuweisende Antigen enthalten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Träger Latexpartikel, insbesondere solche aus Polystyrol, verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Latexpartikel mit einem Durchmesser von 1 µm verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Reaktionsgemisch verwendet, das als Konjugat Protein-A-Gold-Konjugat, Protein-G-Gold-Konjugat, Anti-Antikörper-Gold-Konjugat, Fc-reaktives Protein-FITC-Konjugat oder Protein-A + G-Farblatex-Konjugat enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Reaktionsgemisch verwendet, das als Konjugat Protein-A-Gold-Konjugat und/oder Protein-G-Gold-Konjugat enthält, und daß die Goldpartikel einen mittleren Durchmesser von 20 nm aufweisen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Reaktionsgemisch verwendet, das die Reaktionspartner in einer Pufferlösung, insbesondere einer physiologischen Pufferlösung, enthält.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das nachzuweisende Antigen enthaltende Aggregate vom Reaktionsgemisch durch Filtrieren abtrennt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Filtrieren mit Hilfe einer Membran, insbesondere einer Nylonmembran, ausführt.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Filtrieren durch Anwenden von Vakuum oder durch Anordnen eines saugfähigen Kissens unter den Filter, insbesondere der Membran, unterstützt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die auf dem Filter zurückgehaltenen Aggregate wäscht.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man mit Hilfe einer Detergenspufferlösung wäscht.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Reaktionsgemisch 30 bis 120 sek lang, vorzugsweise 60 sek lang bei einer Temperatur von 19 bis 30 °C inkubiert.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Reaktionsgemisch aus zwei Komponenten bildet, wobei die Komponente I den beschichteten Träger und Konjugat und die Komponente II antigenspezifische monoklonale Antikörper enthält, daß man die Antigenprobe der Komponente II zugibt, und daß man dem so erhaltenen Gemisch die Komponente I zusetzt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß man bei der Untersuchung einer nicht oder nur geringfügig IgG-Moleküle enthaltenden Antigenprobe, wie beispielsweise Urin, eine Komponente II verwendet, die zusätzlich zu dem antigenspezifischen, monoklonalen Antikörper unspezifische IgG-Moleküle bzw. deren Fc-Fragmente enthält.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Komponente I und Komponente II in Form von Lösungen in einem Puffer, insbesondere einem physiologischen Puffer/verwendet.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zum Nachweisen von hCG in Urin oder Serum einen partikelförmigen Träger verwendet, der mit Fab- oder F(ab)₂-Fragmenten von einem monoklonalen Anti-hCG-Antikörper beschichtet ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zum Nachweisen von HIV-1 p24-Antigen einen Träger verwendet, der mit Fab- oder F(ab)₂-Fragmenten von einem monoklonalen Anti-p24-Antikörper beschichtet ist.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zum Nachweisen von Hepatitis-B-Antigen in Serum oder Plasma einen Träger verwendet, der mit Fab- oder F(ab)₂-Fragmenten von einem monoklonalen Anti-Hepatitis-B-Antikörper beschichtet ist.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zum Nachweisen von PMSG einen Träger verwendet, der mit Fab- oder F(ab)₂-Fragmenten von einem monoklonalen Anti-PMSG-Antikörper beschichtet ist.
20. Mittel zum Nachweisen eines in einer Probe enthaltenen Antigens, insbesondere zur Anwendung beim Durchführen des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Mittel aus einer Komponente I und einer Komponente II besteht, daß die Komponente I einen partikelförmigen Träger, der mit Fab- oder F(ab)₂-Fragmenten eines für das nachzuweisende Antigen spezifischen Antikörpers beschichtet ist, und ein Konjugat enthält, das aus wenigstens einem zum Fc-Fragment von Antikörpern reaktiven Protein und einem Indikator besteht, daß die Komponente II für das zu bestimmende Antigen spezifische, monoklonale Antikörper und gegebenenfalls bezüglich des nachzuweisenden Antigens unspezifische IgG-Moleküle bzw. deren Fc-Fragmente enthält.
21. Mittel nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Träger aus Latexpartikeln, insbesondere solchen aus Polystyrol, besteht.
22. Mittel nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Latexpartikel einen durchschnittlichen Durchmesser von 1 µm besitzen.
23. Mittel nach einem der Ansprüche 20 bis 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Indikator Gold, Pigment, FITC oder gefärbte Kunststoffteilchen ist.

24. Mittel nach einem der Ansprüche 20 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Indikator Gold-Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 20 nm sind.
- 5 25. Mittel nach einem der Ansprüche 20 bis 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Komponente I als Konjugat Protein-A-Gold-Konjugat, Protein-G-Gold-Konjugat, Anti-Antikörper-Gold-Konjugat, Protein-A-FITC-Konjugat oder Protein-A + G-Farblatex-Konjugat enthält.
26. Mittel nach einem der Ansprüche 20 bis 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Komponenten I und II Lösungen in einem Puffer, insbesondere einem physiologischen Puffer, sind.
- 10 27. Mittel nach einem der Ansprüche 20 bis 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß der partikelförmige Träger mit wenigstens einem Fab- oder F(ab)₂-Fragment der nachstehend genannten Antikörper beschichtet ist:
- 15 bezüglich viraler Antigene spezifische monoklonale Antikörper,
bezüglich bakterieller Antigene spezifische monoklonale Antikörper,
bezüglich zellulärer und extrazellulärer Antigene spezifische monoklonale Antikörper,
monoklonale Anti-hCG-Antikörper,
monoklonale Anti-p24-Antikörper,
Anti-Hepatitis-B-Antikörper,
20 monoklonale Anti-PMSG-Antikörper,
bezüglich Mykotoxinen spezifische monoklonaler Antikörper,
bezüglich Tumormarker spezifischer monoklonaler Antikörper.

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

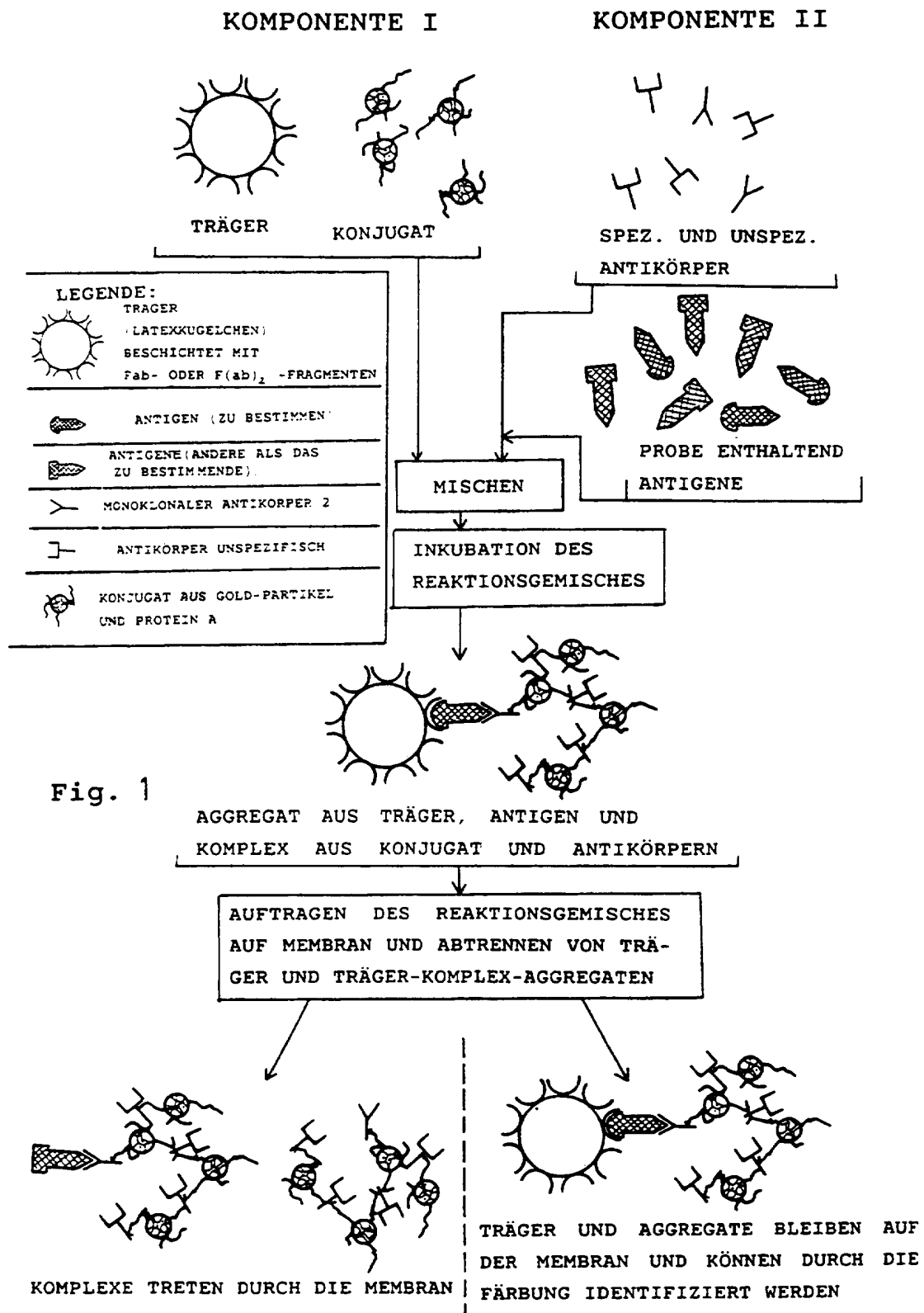


Fig. 1

Fig. 2

