



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **245 054 A1**

4(51) G 01 N 33/577

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 282 346 4	(22)	01.11.85	(44)	22.04.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Friedrich-Schiller-Universität Jena, 6900 Jena, August-Bebel-Straße 4, DD

(72) Diener, Christian, Dr. med.; Schlenvoigt, Gerhard, Dr. rer. nat.; Fuster-Canales, Regine, Dr. med., DD

(54) Verfahren zur Bestimmung der Allergenaktivität

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Allergenaktivität an einer Flüssigkeitsprobe suspendierten Partikeln, unter Verwendung eines speziellen Immunoassay. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, das die gesamte Allergenaktivität erfaßt und deren rasche Ermittlung ermöglicht, und das für Depotallergenextrakte einsetzbar ist. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man nach dem Zusammenbringen der an suspendierte Partikel gebundenen allergenen Substanz mit einem spezifischen Antikörper die nicht an dem gebildeten binären Komplex gebundenen Antikörper abtrennt und mittels einem speziellen Immunoassay bestimmt.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Bestimmung der Allergenaktivität an in einer Flüssigkeitsprobe suspendierten Partikeln, bei dem man einen ersten binären Komplex aus der allergenen Substanz an den suspendierten Partikeln und einem spezifischen Antikörper bildet, indem man die Probe mit den spezifischen Antikörpern in Berührung bringt, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die nicht im ersten binären Komplex gebundenen Antikörper vom binären Komplex abtrennt und immunometrisch bestimmt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nicht im ersten binären Komplex gebundenen Antikörper mit einer an eine feste Phase gebundenen allergenen Substanz einen zweiten binären Komplex bilden, daß nach Abtrennen der Flüssigkeit von der festen Phase der zweite binäre Komplex mit einem spezifisch mit dem genannten ersten Antikörper reagierenden Antikörper umgesetzt wird und einen ternären Komplex bildet, daß nach Abtrennen der Flüssigkeit von der festen Phase der ternäre Komplex mit einem markierten Antikörper, der spezifisch reagiert mit dem zur Bildung des ternären Komplexes zugegebenen Antikörper, zur Umsetzung gebracht wird und einen quarternären Komplex bildet, und daß die Aktivität des quarternären Komplexes bestimmt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die suspendierten Partikel aus Aluminiumhydroxid bestehen.
4. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper des ersten binären Komplexes ein IgE-Antikörper ist.
5. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Abtrennung des ersten binären Komplexes mittels Zentrifugation erfolgt.
6. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die allergene Substanz der beiden binären Komplexe identisch ist.
7. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als allergene Substanz vorzugsweise Gräserpollenextrakt eingesetzt wird.
8. Verfahren nach Punkt 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die feste Phase des zweiten binären Komplexes vorzugsweise aus Polystyrol besteht.
9. Verfahren nach Punkt 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper zur Bildung des ternären Komplexes vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper ist.
10. Verfahren nach Punkt 2 und 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß der monoklonale Antikörper ein Anti-IgE-Antikörper ist.
11. Verfahren nach Punkt 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Antikörper zur Bildung des quarternären Komplexes mit einem Enzym markiert ist.
12. Verfahren nach Punkt 2 und 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Enzymaktivität des quarternären Komplexes dadurch bestimmt wird, indem man zum quarternären Komplex ein Substrat zugibt.
13. Verfahren nach Punkt 2, 11 und 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Enzymaktivität photometrisch gemessen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Allergenaktivität an in einer Flüssigkeitsprobe suspendierten Partikeln, insbesondere für Gräserdepotallergenextrakte, unter Verwendung eines Immunoassay. Sie findet Anwendung bei der Herstellung, Qualitätsbeurteilung und Standardisierung von Allergenextrakten, die zur Therapie allergischer Erkrankungen eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösung

Es ist bekannt, bei der Bestimmung der Allergenaktivität die RAST-Hemmungsmethode einzusetzen. Dabei wird die Allergenaktivität auf Grund der Fähigkeit der Allergene, spezifische IgE-Antikörper zu binden, beurteilt. Dieser Methode liegt zugrunde, daß spezifische IgE-Antikörper in einer Vorinkubation mit einer Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Allergenextraktes reagieren und die Abnahme der Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper eines Standardserums verglichen wird mit der Gesamtkonzentration des Standardserums, also Vorinkubation ohne Allergenextrakt. Die nichtumgesetzten spezifischen IgE-Antikörper werden danach mit einer allergenbeladenen Papierscheibe inkubiert und der dabei gebildete Allergen-IgE-Komplex reagiert anschließend mit isoto- oder enzymmarkiertem polyklonalen Anti-IgE. Unter Verwendung der Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Allergenextraktes lassen sich die Meßwerte in Form einer RAST-Hemmungskurve graphisch darstellen.

Nachteilig bei der RAST-Hemmungsmethode ist der Aufwand im Labor, von Material und Zeit, da von jedem zu untersuchenden Allergenextrakt, einschließlich eines Referenzextraktes, mit der Verdünnungsreihe seine RAST-Hemmungskurve zu ermitteln ist. Ferner ist nach US-PS 4 127 385 ein Verfahren zur Bestimmung der Allergenaktivität von an Aluminiumhydroxid adsorbierten Allergenextrakten beschrieben, bei welchem die Allergenaktivität direkt an den suspendierten Partikeln gemessen wird. Da aber in einer Suspension nicht die gesamte allergene Substanz an die adsorbierenden Partikel gebunden ist, sondern auch allergene Substanz ungebunden in der Lösung verbleibt, erfaßt diese Methode nicht die gesamte Allergenaktivität der zu untersuchenden Probe. Die Gesamtallergenaktivität ist jedoch für den therapeutischen Einsatz des Allergenextraktes entscheidend.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, über einen längeren Zeitraum Allergenextrakte konstanter Qualität für die Anwendung in der Medizin zur Verfügung zu haben.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Bestimmung der Allergenaktivität zu schaffen, welches die genannten Nachteile der bekannten Verfahren beseitigt, indem die gesamte Allergenaktivität erfaßt und deren rasche Ermittlung ermöglicht, und das für Depotallergenextrakte einsetzbar ist. Durch Einsatz eines speziellen Immunassay soll im Vergleich zur RAST-Hemmungsmethode ein vereinfacht durchführbares Verfahren angewendet werden.

Die Aufgabe wird mittels einem Verfahren zur Bestimmung der Allergenaktivität an in einer Flüssigkeitsprobe suspendierten Partikeln, bei dem man einen ersten binären Komplex aus der allergenen Substanz an den suspendierten Partikeln und einem spezifischen Antikörper bildet, indem man die Probe mit den spezifischen Antikörpern in Berührung bringt, erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man die nicht im ersten binären Komplex gebundenen Antikörper vom binären Komplex abtrennt und immunometrisch bestimmt. Dabei wird ein Immunoassay eingesetzt, wobei die nicht im ersten binären Komplex gebundenen Antikörper mit einer an eine feste Phase gebundenen allergenen Substanz einen zweiten binären Komplex bilden, daß nach Abtrennen der Flüssigkeit von der festen Phase der zweite binäre Komplex mit einem spezifisch mit dem genannten ersten Antikörper reagierenden Antikörper umgesetzt wird und einen ternären Komplex bildet, daß nach Abtrennen der Flüssigkeit von der festen Phase der ternäre Komplex mit einem markierten Antikörper, der spezifisch reagiert mit dem zur Bildung des ternären Komplexes zugegebenen Antikörper zur Umsetzung gebracht wird und einen quarternären Komplex bildet, und daß die Aktivität des quarternären Komplexes bestimmt wird.

Die Bestimmung der Allergenaktivität erfolgt auf die Weise, daß die im ersten binären Komplex gebundenen Antikörper nicht mehr ausreichend zur Bildung des zweiten binären Komplexes zur Verfügung stehen und daraus eine Verminderung des Titers dieser Antikörper im Vergleich zu einer nichtgehemmten Probe resultiert.

Als Depotallergenextrakt wird eine an Aluminiumhydroxid gebundene allergene Substanz eingesetzt, welche mit einem IgE-Antikörper unter Bildung des ersten binären Komplexes reagiert. Die Abtrennung dieses binären Komplexes erfolgt mittels Zentrifugation. Die allergene Substanz des zweiten binären Komplexes ist mit der des ersten binären Komplexes identisch, wobei vorzugsweise Gräserpollenextrakt eingesetzt wird. Die feste Phase des zweiten binären Komplexes besteht zweckmäßigerweise aus Polystyrol. Der Antikörper, der zur Bildung des ternären Komplexes verwendet wird, ist vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper, wobei es sich um ein Anti-IgE handelt. Der Antikörper, der zur Bildung des quarternären Komplexes eingesetzt wird, ist mit einem Enzym markiert. Die Enzymaktivität des gebildeten quarternären Komplexes kann in bekannter Weise durch Zugabe eines Substrates bestimmt und photometrisch gemessen werden.

Die Erfindung gewährleistet, die Gesamtallergenaktivität von Depotallergenextrakten auf schnellem und einfachen Wege dadurch zu bestimmen, daß aus der nichtgehemmten Reaktion eines IgE-Standardserums, das den ersten Antikörper enthält, eine Standardkurve gewonnen wird, und diese zur Bewertung dient. Damit lassen sich gleichzeitig beliebig viele Depotallergenextrakte untersuchen.

Ausführungsbeispiel

- Das Wesen der Erfindung soll anhand des nachfolgenden Ausführungsbeispiels zur Bestimmung der Allergenaktivität von Depotallergenextrakten, z. B. 3-Grasdepotallergenextrakte oder 21-Grasdepotallergenextrakte, näher erläutert werden. 50 µl Gräserdepotallergenextrakt werden in 2,5 ml PBS-TWEEN verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung werden in Polystyrol-Spitzröhrchen mit 400 µl eines IgE-Standardserums, welches mit PBS-TWEEN 1:4 vorverdünnt ist, versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das IgE-Standardserum enthält in hoher Konzentration eine konstante Menge spezifischer IgE-Antikörper gegen Gräserpollenallergene. Während der Inkubation werden diese IgE-Antikörper spezifisch an die an den suspendierten Partikeln adsorbierte allergene Substanz gebunden. Nach der Inkubation werden die Polystyrol-Spitzröhrchen 30 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Im Anschluß daran erfolgt die Bestimmung der im Überstand noch nachweisbaren nicht gebundenen spezifischen IgE-Antikörper. Dazu werden Polystyrol-Mikrotiterplatten mit der gleichen allergenen Substanz, wie die, die an den suspendierten Partikeln adsorbiert ist, beladen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 50 µl des IgE-haltigen Überstandes. Nach 90 Minuten Inkubation wird die flüssige Phase entfernt und die feste Phase 3mal mit PBS-TWEEN gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 50 µl monoklonalen Anti-IgE-Antikörpers. Nach 90 Minuten wird erneut die flüssige Phase entfernt und die feste Phase 3mal gewaschen. Danach erfolgt die Zugabe von 50 µl eines Peroxidase-markierten Anti-Maus-Antikörpers. Nach 90 Minuten Inkubation wird die Trenn- und Waschprozedur wiederholt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 50 µl Substratlösung, bestehend aus 4 mg OPD, 5 µl 30%iges H₂O₂ und 10 ml Phosphat-Zitronensäure-Puffer, Nach 30 Minuten wird mit 200 µl 1 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion der Lösung bei 492 nm gemessen. Die gemessene Extinktion des Überstandes aus der Reaktion des Gräserdepotallergenextraktes mit IgE-Standardserum wird in eine Standardkurve, die aus der nichtgehemmten Reaktion einer Verdünnungsreihe dieser IgE-Antikörper ohne Vorinkubation mit Gräserdepotallergenextrakt gewonnen wird, eingetragen, und so der Anteil der IgE-Antikörper ermittelt, der mit dem Gräserdepotallergenextrakt reagiert hat.