DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 279 547 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

5(51) G 01 N 33/577
G 01 N 33/547
G 01 N 33/543
G 01 N 33/535

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 295 280 0 (22) 15.10.86 (44) 06.06.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Noll, Franz, Dr. Dr. sc. nat.; Below, Petra; Schneider, Frank, Dipl.-Stom.; Gaestel, Matthias, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Dauth, Christoph, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) Immunenzymometrisches Bestimmungsverfahren für den quantitativen Nachweis von Human-Interferon-alpha-2

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Human-Interferon-alpha-2. Das Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines Testsystems, das die quantitative Bestimmung von natürlichem bzw. rekombinantem Human-Interferon-alpha-2 mit Hilfe eines immunchemischen Verfahrens rationell und sicher möglich macht. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß ein erster Antikörper gegen Human-Interferon-alpha an eine feste Phase adsorbiert wird, man die zu bestimmende interferonhaltige Lösung zugibt und nach einer gewissen Inkubationszeit einen zweiten, mit einem Enzym markierten Antikörper hinzufügt und schließlich die Enzymaktivität des an der festen Phase fixierten Immunkomplexes mißt. Anwendungsgebiet der Erfindung sind die Medizin und die Biotechnologie.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentanspruch:

1. Immunenzymometrisches Bestimmungsverfahren für den quantitativen Nachweis von Human-Interferon-alpha-2, **dadurch gekennzeichnet,** daß der erste Antikörper ein polyklonaler Antikörper eines Vertebratenorganismus gegen HuIFN-alpha oder ein monoklonaler Antikörper, der mit HuIFN-alpha-2 reagiert, und der zweite Antikörper mit einem Enzym markiert ist und entweder polyklonaler oder monoklonaler Herkunft ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß der erste Antikörper an die feste Phase entweder angetrocknet oder durch feuchte Beladung an die Wände des Reaktionsgefäßes absorbiert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung von quantitativen Bestimmungen von Human-Interferon-alpha-2, das für die medizinische Diagnostik, die biomedizinische Grundlagenforschung und für die Prozeßführung bei der biotechnologischen Herstellung von Interferon-alpha-2 benötigt wird.

Charakteristik der bekannten technischen Lösung

Interferone (IFN) sind körpereigene Stoffe, die im Rahmen der Abwehrreaktion des Organismus gegen virale Infektionen gebildet werden und eine Infektionsausbreitung verhindern. Die IFNe haben großes medizinisches und biologisches Interesse auf sich gezogen, weil sie neben ihrer antiviralen Wirksamkeit auch proliferationshemmend wirken sowie eine immunodulatorische Aktivität aufweisen. Die Heterogenität dieser Stoffklasse macht die Verfügbarkeit molekularspezifischer Bestimmungsmethoden notwendig.
Bisher erfolgt auch in internationalem Maßstab der quantitative Nachweis von Interferonen über die Bestimmung ihrer antiviralen Aktivität. Gemessen wird hierbei die Hemmung einer Infektionsausbreitung in einer in vitro-Zellkultur, d.h. die Unterdrückung des durch das infizierende Virus hervorgerufenen cytopathischen Effektes (CPE). Die Resultate werden in internationalen Einheiten (IU) angegeben. Eine Einheit ist definiert als der reziproke Wert jener IFN-Verdünnung, die entweder die Virusplaque-Bildung zu 50% hemmt oder 50% des Zellrasens schützt. Eine IU entspricht 1–5pg Human-Interferon-alpha. Diese Methode der Konzentrationsbestimmung von IFN ist sehr zeitaufwendig, arbeitsintensiv und erfordert eine kostspielige, störanfällige Zellkultur. Da dieser Test auf einem Titrationsverfahren beruht, bei dem eine mehr oder weniger subjektive Titererfassung die Grundlage für die Konzentrationsangabe in einer untersuchten IFN-Lösung darstellt, ergeben sich große Fehlermöglichkeiten, die bis zu 100% betragen können.
Seit der Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen Human-Interferon-alpha (z.B. Secher, D.S. and D.C. Burke, Nature **285**, 446–450/1980 + US-PS 4423147) wurden mehrere immunchemische Methoden beschrieben, um schneller, sicherer und genauer als mit dem biologischen Test IFN-Konzentrationen in Lösungen bestimmen zu können.
Solche immunchemische Verfahren auf der Grundlage des Einsatzes von monoklonalen Antikörpern können auf verschiedenen Testprinzipien beruhen:

a) Radioimmunoassays als kompetetive Bindungstests (Meurs, E. et al., Infect. Immun. **37**, 919–926 (1982); Trotta, P. et al., J. Biol. Resp. Modif. **2**, 348–359 (1983); Pernier, J. et al., J. Nucl. Medicine **25**, 765–772 [1984]).
b) Immunradiometrische Assays (Secher, D.S., Nature **290**, 501–502 [1981]; Staehelin, T. et al., Methods Enzymol. **79**, 589 [1981]; Horovitz et al., in: Immunoenzymatic Techniques, ed. S. Avrameas, p. 193, Elsevier Amsterdam [1983]; Protzmann, W. et al., J. Clin, Microbiol. **22**, 596–599 [1985]).
c) Enzymimmunoassays (Gallati, H., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **20**, 907–914 [1982]; Berthold, W. et al., Arzneimittelforsch. **35**, 364–369 [1985]).

Die beschriebenen Verfahren nutzen mAK bzw. polyklonale Antikörper (aus Antiseren) gegen Human-Interferon-alpha in unterschiedlichen Kombinationen und Testverfahren, wobei Festphasensysteme und -verfahren in Lösung angewendet werden.
Die erreichten Testparameter variieren hinsichtlich der Empfindlichkeit, der Zeitdauer, des Arbeitsaufwandes und des Detektionssystems (Radioaktivität, Enzymaktivität). Bei den beschriebenen Festphasensystemen werden meist Polystryrol-Kugeln in entsprechenden Reagenzgläsern oder PVC-bzw. Polystyroltestplatten als feste Phase eingesetzt. Die Beschichtung der festen Phase mit Antikörpern erfolgt durch Benetzen der Oberfläche des Plastmaterials mit der Antikörper-haltigen Lösung für eine gewisse Zeit.
Die bisher veröffentlichten Verfahren betreffen entweder HuIFN-alpha-2 oder Leukozyten-IFN (HuIFN-alpha). Für HuIFN-alpha-1 gibt es bisher keine publizierte immunchemische Bestimmungsmethode. Die Firma Cell Tech verkauft einen Testkit mit dem mAK „JOK", mit dem es möglich sein könnte, HuIFN-alpha-1 zu bestimmen; ohne daß dies im Prospekt ausgewiesen wäre. Die Testempfindlichkeit der einzelnen vorgeschlagenen Verfahren wird unterschiedlich angegeben und hängt in erheblichem Maße von den Testbedingungen ab.
Mit extrem langen Testzeiten, die für Routinebestimmungen nicht akzeptabel sind, sollen für HuIFN-alpha-2 noch 5 IU/ml nachweisbar sein.
Die Nachteile der bisher bekannten immunchemischen Verfahren zum quantitativen Nachweis von Human-Interferon-alpha sind in der Art und Weise der Beschichtung der Plastmaterialien, der z.T. sehr langen Reaktionszeiten, der langen Meßzeiten und der in einigen Fällen beschriebenen komplizierten Technik zur Trennung von freien und gebundenen Radioaktivitäten (bei den auf kompetitiver Bindung beruhenden Radioimmunoassays) begründet.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, Human-Interferon-alpha-2 mit Hilfe eines immunenzymometrischen Testes unter Verwendung des Zwei-Seiten-Systems in rationeller Weise quantitativ, schnell und sicher bestimmen zu können, wobei wegen der Vermeidung des Einsatzes von Radioaktivität ein umweltfreundliches Verfahren zur Anwendung kommen soll.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zum quantitativen Nachweis von Human-Interferon-alpha-2 mit Hilfe eines immunchemischen Verfahrens in Form eines immunenzymometrischen Assays ist dadurch gekennzeichnet, daß der erste Antikörper an die Oberfläche der Näpfe von Mikrotestplatten aus Polystyrol oder einem anderen Material wie z. B. PVC als Trägermaterial für den Festphasen-Immunoassay angetrocknet wird. Solche Antikörper-beschichteten Platten sind bei 4°C in trockenem Zustand für mehrere Wochen haltbar. In die Reaktionsnäpfe der mit Antikörpern beschichteten Platten werden erfindungsgemäß nacheinander zuerst die zu messende IFN-haltige Lösung, dann der 2. Antikörper (z. B. monoklonaler Antikörper), der mit Meerrettich-Peroxydase nach bekanntem Verfahren markiert ist, eingefüllt und inkubiert.
Ein bevorzugt eingesetzter mAK ist ZIM-IIB2 (ZIM-Liste 1986 0086). Nach gründlichem Waschen der Reaktionsgefäße wird eine Substratlösung (Farbstoff) zugegeben, und nach angemessener Reaktionszeit die Reaktion durch Zugabe einer Säure gestoppt. Die entstandene Färbung in den einzelnen Näpfen der Mikrotiterplatte wird schließlich durch photometrische Messung der Extinktion an einem entsprechend geeigneten Photometer quantifiziert.
Alle Arbeiten lassen sich bei Zimmertemperatur durchführen. Der Test läuft als „one-tube-assay" und ist damit sehr einfach und leicht handhabbar. Die Testanordnung gestattet die gleichzeitige Bestimmung von vielen Proben durch eine Person in weniger als 5 Stunden. Der Test ist sowohl für natürliches wie für rekombinantes Human-IFN-alpha-2 geeignet, darüber hinaus auch für die Bestimmung von Hybrid-IFN-Molekülen, die Epitope enthalten, mit denen mAK gegen Human-IFN-alpha-2 reagieren.
Die Erfindung soll an einem Ausführungsbeispiel noch näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

Immunenzymometrisches Bestimmungsverfahren für den quantitativen Nachweis von Human-Interferon-alpha-2:
Als Reaktionsgefäße werden die Näpfe von 96er-Mikrotestplatten verwendet. In die einzelnen Näpfe werden je 200 µl des ersten Antikörpers (polyklonale anti-Human-Interferon-alpha-Antikörper vom Schaf; 25 µg/ml Beschichtungspuffer der Zusammensetzung 0,015 M Na_2CO_3 – 0,035 M $NaHCO_3$ – 0,02% NaN_3-*p*H 9,6; 5000 Neutralisationseinheiten/ml) einpipettiert und über Nacht bei 37°C angetrocknet. Anschließend werden die Näpfe der Mikrotestplatten je mit 200 µl TBS (Tris-gepufferte Salzlösung: 0,05 M Tris-0,2 M NaCl, *p*HH 7,4 – 0,1% Tween 20) oder mit 200 µl einer proteinhaltigen Lösung in TBS gefüllt und zwecks Blockierung der noch freien proteinbindenden Stellen für 1 Std. bei Zimmertemperatur inkubiert und dann wieder ausgegossen. Danach werden 100 µl einer IFN-Standard-Lösung bzw. der zu untersuchenden Probe verschiedenen Verdünnungsgrades eingefüllt und für 3 Stunden inkubiert (Schüttel in feuchter Kammer). Nach 3maligem Waschen mit H_2O werden 50 µl des mit Peroxydase markierten mAK ZIM-IIB2 eingefüllt und für 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert (Schütteln in feuchter Kammer). Nach mindestens 5maligem Waschen mit H_2O werden in die einzelnen Näpfe jeweils 240 µl einer Substratlösung z. B.:

O-Phenylendiamin	0,4 mg/ml
H_2O_2	0,015%ig
Phosph.-Zitratpuffer	*p*H 5,0

einpipettiert und für einige Minuten (z. B. 15 Minuten) inkubiert. Mit 60 µl 2,5 N H_2SO_4 wird die Farbreaktion in den Näpfen abgestoppt. Die Farbintensität in den einzelnen Näpfen wird schließlich photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.
Aus der gemessenen Extinktion kann anhand der Standardkurve der IFN-alpha-2-Gehalt einer Lösung ermittelt werden.