

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1505/95

(51) Int.Cl.⁶ : **C12Q 1/68**
G01N 33/53

(22) Anmeldetag: 11. 9.1995

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 6.1997

(45) Ausgabetag: 26. 1.1998

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0657530A2 EP 0338591A2 US 5346999A US 4830969A

(73) Patentinhaber:

STEINDL FRANZ DIPL.ING. DR.
A-1218 WIEN (AT).

(54) IMMUN- UND PROTEINKOMPLEX-DISSOZIIERUNG

(57) Beschrieben wird ein Reagens zur Freisetzung von thermostabilen Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren, welches Natriumdodecylsulfat (SDS) und Diethylentriaminpentaessigsäure (DETAPAC) oder ein Salz hiervon als Chelatbildner umfaßt, sowie ein Verfahren zur Freisetzung von thermostabilen Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren in einer Probe, wobei die Probe mit dem erfindungsgemäßen Reagens gemischt, erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt wird.

AT 403 378 B

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Reagens zur Freisetzung von Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren sowie ein Verfahren zur quantitativen Freisetzung von Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren.

Bisher werden immunchemische Tests wie ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), RIA (Radio Immuno Assay), FIA (Fluorescence Immuno Assay), Agglutinationstests und Präzipitationstests in ihren unterschiedlichsten Variationen eingesetzt, um sehr selektiv und sensitiv bestimmte Moleküle zu detektieren und auch zu quantifizieren. Diese Methoden basieren alle auf Antigen-Antikörperreaktionen. Bei der Bestimmung von Antigenen aus Körperflüssigkeiten von Menschen und Tieren gibt es jedoch sehr oft Probleme, da bedingt durch die Abwehrreaktion des Organismus die Antigene mit körpereigenen Antikörpermolekülen reagieren und so Immunkomplexe bilden oder die Proteine in natürlicher Form assoziiert mit anderen Proteinen vorliegen. Derart gebundenen Antigen-moleküle sind in immunchemischen Tests kaum oder überhaupt nicht detektierbar. Speziell bei medizinischen Fragestellungen, wie z.B. der Bestimmung von viralen oder bakteriellen Antigenen sowie von Tumormarkern, wird durch die Bildung von Immunkomplexen eine quantitative Antigenbestimmung teilweise unmöglich.

Zusätzlich ist das Ausmaß der Bildung von Immunkomplexen oder auch der Proteinkomplex-Dissoziation zeitlich und individuell extrem unterschiedlich.

Mit bisher publizierten und angewandten Verfahren zur Freisetzung von Antigenen ist keine allgemein befriedigende und konstant hohe Ausbeute erzielbar. Zur Zeit angewandte Verfahren sind die Säure-Dissoziation, z.B. nach Ascher et al. ("Acidification-modified p24 antigen capture assay in HIV-seropositives", Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 5, 1080-1083, 1992) und die Hitze-Dissoziation, z.B. nach Schüpach et al. ("Quantitative and sensitive detection of immune-complexed and free HIV antigen after boiling of serum", Journal of Virological Methods, 43, 247-256, 1992).

Beim Säure-Dissoziierungsverfahren werden die Proben mit einem stark sauren Puffer versetzt, eine bestimmte Zeit lang inkubiert und anschließend durch Zugabe eines alkalischen Puffers wieder neutralisiert. Die hauptsächlichsten Nachteile des Säure-Dissoziierungsverfahren sind wie folgt.

1. Nicht alle Antigen-Antikörperbindungen können durch Zugabe eines stark sauren Puffers oder Säure gelöst werden. Dies ist abhängig von der Art des Epitops und den Eigenschaften der involvierten Antikörper.
2. Durch dieses Verfahren können nicht alle Antikörper soweit denaturiert werden, daß sie nach erfolgter Neutralisation nicht wieder Immunkomplexe bilden.
3. Durch die starke Absenkung des pH-Wertes (auf etwa pH 2,0) kommt es je nach Proteingehalt der Probe zu einer unkontrollierten sauren Proteinpräzipitation, die teilweise unlösliche Präzipitate mit sich bringt. In diesen Präzipitaten kann ein erheblicher Anteil von Immunkomplexen und freie Antigenmolekülen eingeschlossen sein und daher der Nachweisreaktion entzogen werden.

Beim Hitze-Dissoziierungsverfahren werden die Proben mit destilliertem Wasser oder 0,5% Triton X-100® Lösung 1:3 verdünnt und ein paar Minuten in einem kochenden Wasserbad inkubiert. Die hauptsächlichsten Nachteile des Hitze-Dissoziierungsverfahren sind wie folgt.

1. Bei höherem Proteingehalt der Probe ist diese Methode nicht geeignet, da es zu einer allgemeinen Hitzekoagulierung kommt und die Proben daher völlig ausagelieren.
2. Bei proteinarmen Proben ist es von der Art und Größe der vorhandenen Immunkomplexe abhängig, ob es zu einer teilweisen Auflösung oder vorwiegend zu einer Koagulierung der Immunkomplexe kommt.

In der EP-0 657 530-A2, der EP-0 338 591-A2, der US-5 346 999-A und der US-4 830 969-A wird jeweils die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in einem Verfahren zur Extraktion von z.B. Nukleinsäuren aus biologischen Proben, wie Zellen, beschrieben.

Bei Verwendung von EDTA als Chelatbildner ist eine weitere Behandlung der Proben, wie durch Extraktion, Zentrifugation, Waschen oder dergleichen, erforderlich. Trotz derartiger Reinigungsschritte können z.B. bei hämolytischen Proben (Seren, Plasma etc.) durch EDTA maskierte Schwermetallionen, wie Eisen, die auch nach Waschschritten im Reaktionsgefäß verbleiben, bei einem ELISA mit Peroxidase falsch positive Ergebnisse liefern.

Die US-5 395 555-A betrifft eine wässrige Reinigungslösung für durch Urin stark verschmutzte Teppiche und dgl., welche Reinigungslösung eine Kombination von DETAPAC und SDS umfaßt. Eine mögliche Verwendung dieser Reinigungslösung in einem Reagens zur Freisetzung von thermostabilen Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren wird nicht offenbart.

Eine erste Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile der bisher bekannten Dissoziierungsverfahren zu überwinden und ein Reagens zur Freisetzung von thermostabilen Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Reagens zur Freisetzung von thermostabilen Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren Natriumdodecylsulfat (SDS) und

Diethylentriaminpentaessigsäure (DETAPAC bzw. DTPA) oder ein Salz hiervon als Chelatbildner umfaßt.

Natriumdodecylsulfat (im folgenden mit SDS abgekürzt) wird bisher standardmäßig bei der SDS-Elektrophorese in einer Konzentration von 1-2 % eingesetzt. Durch die Anlagerung von SDS an die vorhandenen Proteine werden diese mit einer Vielzahl von negativen Ladungen versehen, wodurch die
 5 Mobilität im elektrischen Feld verbessert und die Laufrichtung der Proteine zur Anode hin ausgerichtet wird. Durch einen Gradienten in der Gelmaschenweite werden die Moleküle derart nach der Größe aufgetrennt. Dies bedingt auch, daß der vorhandene große Überschuß an ungebundenem SDS von den Proteinen getrennt wird und bei eventuell nachfolgenden immunchemischen Reaktionen, wie z.B. Westernblot, nicht stört. Bei einem immunchemischen Test wird jedoch jede Reaktion durch in der Probe vorhandenem freien
 10 SDS (bereits im Bereich von Zehntel Promille) stark negativ beeinträchtigt. Da eine Abtrennung von SDS aus der Probe sehr aufwendig ist (Ultrafiltration; Diafiltration, etc.) und diese Verfahren überdies teuer und nie quantitativ reproduzierbar sind, wurde SDS bei quantitativen Test wie ELISA, RIA etc., bisher nicht zur Auflösung von Immunkomplexen eingesetzt. Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß eine Lösung umfassend SDS zur besseren Solvatisierung von Proteinen und Destrukturierung komplexer
 15 Proteine sowie einen Chelatbildner zur effektiven Maskierung von freien Schwermetallionen erfolgreich als Reagens zur Freisetzung von thermostabilen Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren eingesetzt werden kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Reagens sind SDS und der Chelatbildner in einem Masseverhältnis von 4 : 1 oder höher vorhanden. Ein derartiges Masseverhältnis
 20 stellt sicher, daß einerseits die vorhandenen Proteine wirksam solvatisiert bzw. - falls vorhanden - die Strukturen komplexer Proteine aufgebrochen werden und andererseits freie Schwermetallionen durch den Chelatbildner effektiv maskiert werden.

Günstig ist auch, wenn SDS und der Chelatbildner in wässriger Lösung vorliegen. Eine derartige Lösung ist sofort einsatzbereit, insbesondere zur Verwendung bei biologischen Proben geeignet und weist
 25 auch eine ausreichende Stabilität auf. Die Reagenslösung wird dabei in Übereinstimmung mit der Proteinmatrix der Proben unverdünnt oder entsprechend mit destilliertem Wasser vorverdünnt eingesetzt.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein verlässliches und reproduzierbares Verfahren zur quantitativen Freisetzung von Antigenen aus Immunkomplexen oder Proteinkomplexen sowie von
 30 DNA und RNA aus Zellen und Viren in einer Probe für eine quantitative Bestimmung von Antigenen bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Probe mit dem vorstehend beschriebenen Reagens gemischt, erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Als Proben kommen insbesondere Körperflüssigkeiten, wie Serum, Plasma, Lympheflüssigkeit und Schleimabsonderungen, sowie Zellkulturüberstände in Betracht. Allgemein kann das erfindungsgemäße Verfahren jedoch an
 35 jeglicher Probe eingesetzt werden.

Dabei ist besonders günstig, wenn der pH der Reaktionslösung auf 7,0 bis 7,4 eingestellt wird, beispielsweise mit 1N NaOH, und die thermische Behandlung bei einer Temperatur von 60 bis 100 °C während 3 bis 60 Minuten erfolgt.

Vorzugsweise wird die Probe dabei mit dem Reagens in einem Volumsverhältnis von etwa 1 : 2
 40 gemischt.

Günstig ist auch, wenn die Konzentration von SDS und dem Chelatbildner durch Verdünnen des Reagens an die Proteinkonzentration der Probe angepaßt wird. Das Verfahren kann so ganz einfach dem Verbrauch an Reagens durch die Proteinmatrix der Probe angepaßt werden und ein störender Einfluß bedingt durch die Reaktionslösungskomponenten in nachfolgenden Tests wie z.B. ELISAs kann dadurch
 45 vermieden werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielsweise wie folgt durchgeführt.

Die beispielsweise Antigene gänzlich oder teilweise in gebundener Form als Immunkomplexe enthaltenen Proben werden mit einer wässrigen Lösung des erfindungsgemäßen Reagens im Verhältnis 1:2 in verschließbaren Reaktionsgefäßen gemischt. Dann werden die Reaktionsgefäße einer thermischen Behandlung in einem Wasserbad ausgesetzt (3-60 min. bei 60-100 °C) und anschließend wieder rasch auf
 50 Raumtemperatur abgekühlt.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht dabei eine allgemein konstante Freisetzung von Antigenmolekülen aus Immunkomplexen, Proteinkomplexen, sowie von DNA und RNA aus Zellen oder Viren. Mit dem erfindungsgemäßen Reagens wird durch die optimierte SDS-Konzentration eine derartige Solvatisierung von
 55 Proteinmolekülen erreicht, daß diese kolloidal in Lösung gehen und auch in Lösung bleiben. Durch die Kombination mit der thermischen Behandlung werden thermolabilere Proteine, wie Antikörper die aus mehreren Proteinketten bestehen, soweit denaturiert, daß weder eine Antigenbindung noch eine intakte Molekülstruktur aufrecht bleibt und auch keine ausreichende Renaturierung möglich ist. Durch die Verwen-

dung von DETAPAC bzw. DTPA oder einem Salz hievon als Chelatbildner im erfindungsgemäßen Reagens
 werden in den Proben vorhandene Schwermetallionen effektiv maskiert. Auf diese Weise werden durch
 Schwermetallionen möglicherweise verursachte unerwünschte Reaktionen, wie unspezifische Proteinbindun-
 gen oder Proteinpräzipitationen, und mögliche Störungen in Tests zur Antigenbestimmung verhindert. Ein
 wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Konzentration an Reagens in
 der Reaktionlösung durch Verdünnen mit destilliertem Wasser einfach an den Proteingehalt und damit dem
 Verbrauch durch Bindung angepaßt werden kann. Dadurch wird eine negative Auswirkung auf die im Test
 eingesetzten Antikörper oder sonstigen Proteinmoleküle vermieden. Bei einem bevorzugten Mischungsver-
 hältnis von 1 (Probe): 2 (Reaktionlösung) wird das Reagens in folgender optimaler Konzentration eingesetzt
 (alle Angaben in %-Masse):

- für humanes oder tierisches Plasma SDS 0,4%, DETAPAC 0,1%
- für humanes oder tierisches Serum SDS 0,2%, DETAPAC 0,05%, (d.h. Verdünnung 1 : 2),
- für Zellkulturüberstände mit 20% FCS (Fetal Calf Serum Albumine) SDS 0,1%, DETAPAC 0,025%,
 (d.h. Verdünnung 1 : 4),
- für Zellkulturüberstände mit 10% FCS SDS 0,05%, DETAPAC 0,0125%, (d.h. Verdünnung 1 : 8).

Eventuell auftretende Denaturierungen des Zielproteins oder der Zielseptide werden dadurch kompensiert,
 daß der Standard in entsprechender Probenmatrix vorverdünnt und gleichbehandelt wird. Die Dauer
 der Hitzebehandlung und die Temperatur werden entsprechend der Hitzestabilität des Proteins oder Peptids
 gewählt, z.B. 4 min. bei 100 °C, 15 min. bei 90 °C, 30 min. bei 80 °C oder 60 min. bei 70 °C).

Die beiliegenden Figuren zeigen:

Fig. 1 einen Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens mit den Verfahren des Standes der Technik
 (Säuredissoziation bzw. Hitzedissoziation) bei der p24 Wiederfindung in humanem Plasma, humanen
 Serum und Zellkulturmedium RPMI mit 10 % FCS,

Fig. 2 einen Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens mit den Verfahren des Standes der Technik
 (Säuredissoziation bzw. Hitzedissoziation) bei der p24 Wiederfindung aus Immunkomplexen, die sich
 mit monoklonalen Antikörpern (IAM M01, IAM 1D7, IAM 37G12 und IAM 3A6) gebildet haben, in
 humanem Plasma, bezogen auf unbehandelten p24 Standard,

Fig. 3 einen Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens mit den Verfahren des Standes der Technik
 (Säuredissoziation bzw. Hitzedissoziation) bei der p24 Wiederfindung aus Immunkomplexen, die sich
 mit monoklonalen Antikörpern (IAM M01, IAM 1D7, IAM 37G12 und IAM 3A6) gebildet haben, in
 humanem Serum, bezogen auf unbehandelten p24 Standard,

Fig. 4 einen Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens mit den Verfahren des Standes der Technik
 (Säuredissoziation bzw. Hitzedissoziation) bei der p24 Wiederfindung aus Immunkomplexen, die sich
 mit monoklonalen Antikörpern (IAM M01, IAM 1D7, IAM 37G12 und IAM 3A6) gebildet haben, in
 Zellkulturmedium RPMI mit 10 % FCS, bezogen auf unbehandelten p24 Standard,

Fig. 5 einen Vergleich eines Verfahrens des Standes der Technik (Säuredissoziation) bei der p24
 Wiederfindung aus Immunkomplexen, die sich mit monoklonalen Antikörpern (IAM M01, IAM 1D7, IAM
 37G12 und IAM 3A6) gebildet haben, in humanem Plasma, humanen Serum und Zellkulturmedium,
 bezogen auf unbehandelten p24 Standard,

Fig. 6 einen Vergleich des Verfahrens des erfindungsgemäßen Verfahrens bei der p24 Wiederfindung
 aus Immunkomplexen, die sich mit monoklonalen Antikörpern (IAM M01, IAM 1D7, IAM 37G12 und IAM
 3A6) gebildet haben, in humanem Plasma, humanen Serum und Zellkulturmedium, bezogen auf unbe-
 handelten p24 Standard,

Fig. 7 zeigt den Testaufbau eines Double Antibody Sandwich ELISAs.

Die nachfolgenden Beispiele bzw. Vergleichsversuche sollen die vorliegende Erfindung erläutern.

1. Beispiel 1: Bestimmung des Verlustes von HIV-1 p24 core Protein durch unterschiedliche Antigenfreiset-
 zungs-Verfahren aus Immunkomplexen (vgl. Fig.1).

1.1 Materialien und Verfahren:

Als HIV-1 Antigen ELISA wurden vorerst die ELISA Testkits der Fa. Coulter (USA) und Fa. Mediators
 (Wien) parallel verwendet. Da die mit beiden Testkits erhaltenen Ergebnisse ident waren, wurde in weiterer
 Folge vorwiegend mit dem Testkit der Fa. Mediators gearbeitet. Als p24-Standard zum Spiken wurde in
 allen Tests der Standard (cell culture derived) vom Testkit der Fa. Mediators verwendet. HIV-1 negatives
 Humanserum und Plasma wurden von der Blutspendezentrale des Roten Kreuzes in Wien bezogen.

Als ELISA-Reader wurde der EAR400 und als Auswertungs-Software Δ -Soft der Fa. SLT (Grödig
 Austria) verwendet. SDS wurde von Merck, Darmstadt, und DETAPAC von Sigma, St. Louis, USA, bezogen.

1.2. Versuch:

P24-Standard (25 ng/ml) wurde parallel in HIV-1 negativem Plasma, Serum und Zellkulturmedium RPMI-1640 mit 10% FCS auf eine Konzentration von 600 pg/ml verdünnt. Dann wurden Aliquote nach den Verfahren des Standes der Technik bzw. nach dem erfindungsgemäßen Verfahren (wie unten beschrieben) behandelt. Die unbehandelten Proben wurden in dem jeweils entsprechenden protischen Medium 1:3 (auf 200 pg p24/ml) verdünnt. Von allen behandelten und unbehandelten Proben wurden eine 1:2 Verdünnungsreihe (8 Verdünnungsstufen) angelegt und Aliquote wurden auf die Testplatten übertragen. Die Auswertung in Fig. 1 zeigt den Verlust von freiem p24 verursacht durch die unterschiedlichen Behandlungsmethoden.

Säuredissoziation: 100 µl Probe + 100 µl 1,5 M Glycin HCl Puffer (pH 2,0) wurden 60 min. bei 37 °C inkubiert, dann mit 100 µl 1,5 M Tris/HCl Puffer (pH 8,5) neutralisiert.

Hitzedissoziation: 100 µl Probe + 200 µl 0,5 % Triton X-100® Lösung wurden 5 min. bei 100 °C im Wasserbad inkubiert.

Erfindungsgemäßes Verfahren: 100 µl Probe + 200 µl Reagenslösung wurden 4 (3-5) min. bei 100 °C inkubiert. Die Konzentration der eingesetzten Reagenslösung war bei humanem Plasma SDS 0,4% und DETAPAC 0,1%, bei humanem Serum SDS 0,2% und DETAPAC 0,05% (1:2 Verdünnung), für Zellkulturüberstände mit 20% FCS (Fetal Calf Serum Albumine) SDS 0,1% und DETAPAC 0,025% (1:4 Verdünnung) und bei Zellkulturmedium mit 10% FCS SDS 0,05% und DETAPAC 0,0125% (1:8 Verdünnung).

1.3. Zu Fig. 1:

Aus Fig. 1 ist ersichtlich, daß der Verlust an HIV-1 p24 core Protein je nach Proteinmatrix und Behandlungsmethode sehr unterschiedlich ist. Die Verluste beim Säuredissoziationsverfahren liegen bei 7 bis 14 %, beim Hitzedissoziationsverfahren bei 26 bis 87 % und beim erfindungsgemäßen Verfahren bei 16 bis 26%.

Beispiel 2: Bestimmung der Wiederfindung von HIV-1 p24 core Protein aus Immunkomplexen durch unterschiedliche Antigenfreisetzungs-Verfahren aus Immunkomplexen.

2.1. Materialien und Verfahren:

Die verwendeten monoklonalen anti HIV-1 p24 Antikörper wurden am IAM (Institut für Angewandte Mikrobiologie in Wien) etabliert und produziert. Sonst wurde dieses Beispiel analog zu Beispiel 1 durchgeführt.

2.2. Versuch:

Um die effektive Freisetzung von HIV-1 p24 core Protein aus Immunkomplexen quantitativ zu bestimmen, wurden zu dem in Beispiel 1 auf 600 pg p24/ml verdünnten Proben mit humanen Plasma, Serum sowie Zellkulturmedium jeweils die monoklonalen anti HIV-1 p24 Antikörper (IAM-24 M01 (Maus); IAM-24 1D7, IAM-24 37G12 und IAM-24 3A6, alle human) zugesetzt. Die Antikörper wurden in konzentrierter Form (Volumsänderung der Reaktionslösung <1%) zugesetzt, so daß die Endkonzentration 1 µg/ml Probe betrug. Diese Proben (jeweils 1 ml) wurden 90 min. bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert damit sich die Immunkomplexe ausbilden. Dann wurden Aliquote den in Beispiel 1 angeführten Antigenfreisetzungsverfahren unterzogen und wie unter Beispiel 1 ausgeführt mittels ELISA quantitativ bestimmt. Die unbehandelten Aliquote wurden mit den jeweils entsprechenden protischen Medien 1:3 verdünnt (200pg HIV-I p24/ml) und parallel getestet.

2.3. Zu Fig. 2:

In Fig.2 sind die Ergebnisse der p24 Wiederfindung in HIV-1 negativem humanen Plasma, gespickt mit einer definierten Menge an HIV-1 p24 core Protein, und den jeweils angeführten monoklonalen Antikörpern, bezogen auf nicht behandelten Standard (ohne Antikörper) dargestellt. Die scheinbar schlechte Immunkomplex-Bildung durch den Antikörper IAM-24 1D7 bei den unbehandelten Proben ist dadurch bedingt, daß der höher affine erste Antikörper im ELISA dasselbe Epitop erkennt und sich daher kompetitiv durchsetzt. Es ist klar ersichtlich, daß das erfindungsgemäße Verfahren wesentlich effektiver als die Verfahren des Standes der Technik ist und auch eine geringere Streuung im Vergleich mit den Verfahren des Standes der Technik aufweist.

2.4. Zu Fig. 3:

In Fig. 3 sind analog zu Fig. 2 die Ergebnisse der p24 Wiederfindung in HIV-1 negativem humanen Serum dargestellt.

2.5 Zu Fig. 4:

In Fig. 4 sind analog zu Fig. 2 die Ergebnisse der p24 Wiederfindung in HIV-1 negativem Zellkulturmedium RPMI 1640 + 10% FCS dargestellt.

Wie aus den Abbildungen der Figs. 2 bis 4 ersichtlich, ist die p24 Wiederfindung bezogen auf den unbehandelten Standard sehr unterschiedlich. Während bei der Säuredissoziation die Schwankungen der Antigenfreisetzung aus Immunkomplexen mit unterschiedlichen Antikörpern sehr groß ist und die Effektivität bei geringerem Gesamtproteingehalt in der Probe abnimmt, steigt diese bei der Hitzedissoziation bei geringerem Gesamtproteingehalt. Im Gegensatz dazu sind die Schwankungen beim erfindungsgemäßen Verfahren wesentlich geringer und die p24 Wiederfindung ist konstant hoch bei zwischen 60 und 70% vom theoretischen Wert.

2.6. Zu Fig. 5 und 6:

In den Fig. 5 und 6 sind die Ergebnisse bezogen auf den jeweils gleichbehandelten Standard dargestellt.

Eine Hitzedissoziation ist, wie aus Fig. 1 bis Fig. 3 ersichtlich, für Proben mit hohem Proteingehalt nicht geeignet. Erst wenn man die Ergebnisse auf einen Standard der jeweils in derselben HIV-1 negativen Probenmatrix vorverdünnt und mit derselben Methode gleichbehandelt wurde bezieht, erhält man den korrekten Wert der p24 Wiederfindung. Dieser zeigt gleichzeitig auch die Effektivität in der Freisetzung des Antigens aus den gebildeten Immunkomplexen.

Aus Fig. 5 ist klar ersichtlich, daß diese bisher weltweit empfohlene Methode der Säuredissoziation je nach Proteingehalt der Probe und in Abhängigkeit von den involvierten Antikörpern großen Schwankungen in der Effektivität unterliegt, welche jedoch meist gering ist.

Analog zur Säuredissoziation in Fig. 5 ist in Fig. 6 die Effektivität des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellt. Es wird mit dieser Methode unabhängig vom Proteingehalt und den Antikörpern konstant eine Freisetzung von ca. 90% erzielt.

3. Beispiel 3:

Es wurden einige 100 HIV-1 positive Sera ohne Behandlung getestet bzw. nach dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelt und getestet. Um die sehr unterschiedlichen Mengen an freiem und gesamtem p24 (freies plus in Immunkomplexen gebundenes p24) zu zeigen, sind nachfolgend repräsentativ in Tab. 1 die Ergebnisse von 20 HIV-1 positiven Seren dargestellt.

Tabelle 1

Serum Nr.	pg freies p24/ml Serum (unbehandelt)	pg gesamtes p24/ml Serum (erfindungsgemäß behandelt)
1	0	30
2	7	2600
3	96	108
4	2	69
5	0	0
6	18	28
7	0	28
8	35	606
9	102	435
10	0	280
11	0	117
12	0	0
13	5	300
14	0	0
15	24	285
16	0	500
17	0	210
18	2040	4235
19	124	1662
20	74	168

4. Beispiel 4:

Es wurden 5 Hepatitis B Surface-Antigen positive Sera getestet (die am Institut für Virologie Prof. Franz Xaver Heinz als HBs-Ag positiv charakterisiert wurden), als Negativ-Kontrolle wurde das entsprechende negative Kontrollserum (Fa. Abbott, USA) verwendet. Die Proben wurden unbehandelt und nach Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren getestet. Als Test wurde "AUSZYME Monoclonal Diagnostic Kit (For detection of Hepatitis B Surface Antigen HBsAg in serum and plasma)" der Fa. Abbott verwendet. Der Test wurde lt. Vorschrift (Procedure D) in der 2 step Version durchgeführt, d.h. die Proben und der enzymmarkierte Antikörper wurden in aufeinanderfolgenden Schritten inkubiert. Die Ergebnisse (freies + gesamtes HBsAg) sind nachfolgend in Tab. 2 dargestellt.

Tabelle 2

Serum Nr.	ng freies HBsAg/ml Serum (unbehandelt)	ng gesamtes HBsAg/ml Serum (erfindungsgemäß behandelt)
1	100	2520
2	5120	6660
3	906	3120
4	228	2640
5	246	11040
neg.	0	0

5. Beispiel 5:

Zur Beweisführung, daß das neue Verfahren auch bei Proteinen oder allgemein Antigenen, die nicht so thermostabil sind wie das HIV-1 p24 core Protein oder das Hepatitis B surface protein, konstante Antigen Freisetzungsraten ergibt, wurde humane CuZn-SOD (Kupfer-Zink-Superoxidismutase) gewählt. CuZn-SOD ist bei 72°C während 10 min. stabil. Die Versuche wurden bei 67°C durchgeführt. Eine detaillierte

Testbeschreibung des verwendeten CuZn-SOD ELISA folgt.

CuZn-SOD reduziert Sauerstoff-Radikale (O_2^-) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und ist im Blut in freier Form ein sehr kurzlebiges Protein (biologische Halbwertszeit ca. 3 min.), die Konzentration im Serum liegt bei ca. 10 bis 60 ng/ml, die Hauptmenge ist in Erythrozyten mit ca. 15 bis 40 μ g/ml Vollblutlysate enthalten.

Klinisch gesehen ist dieses Beispiel weniger relevant, da gegen CuZn-SOD normalerweise keine Antikörper gebildet werden, aber es ist ein gut charakterisiertes Protein mit geringerer Temperatur-Stabilität.

Säuredissoziation ist bei CuZn-SOD nicht anwendbar, da das Enzym bei pH-Werten unter pH 4,0 nicht stabil ist. Bei Hitzedissoziation wurden in Relation zum erfindungsgemäßen Verfahren bei Proben mit unterschiedlichen Proteingehalten vergleichbare Ergebnisse wie in Beispiel 1 und 2 erzielt.

5.1. Versuch:

Es wurden humane Sera von gesunden Spendern verwendet und Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 10% FCS mit CuZn-SOD (25 ng/ml) gespickt. Von den Sera wurde nach erfolgter Quantifizierung der CuZn-SOD eine Probe als Referenzprobe (Standard) ausgewählt. Diese Referenzprobe und ein Aliquot vom gespickten Zellkulturmedium wurden nicht mit spezifischen Antikörpern versetzt, aber ansonsten gleich behandelt. Aliquote der Testproben wurden mit einer Mischung (1:1) von 2 verschiedenen Maus monoclonalen Anti-CuZn-SOD Antikörpern (die auch im Test verwendet werden) in großem Überschuß versetzt (20 μ g/ml Probe) und gemischt. Zur Bildung von Immunkomplexen wurden die Proben 3 Tage lang bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Proben 1:3 mit der Reaktionslösung verdünnt und Aliquote von je 300 μ l wurden 0, 15, 30, 60 und 120 min. in einem Wasserbad mit 67 °C inkubiert und anschließend getestet. In diesem Beispiel wurde bei 30 min. der beste Effekt erzielt. Bei 0 min. ist keine CuZn-SOD detektierbar, bei 15 min. ist der Freisetzungseffekt noch schwach und bei 60 und 120 min. ist eine deutliche Abnahme auch in den Standards zu sehen. Obwohl die Denaturierung der Antikörper bei 67 °C/30 min. nicht so gut ist wie bei 100 °C/4 min., ist die Freisetzungsrate bei verschiedenen Sera und unterschiedlichem Proteingehalt wieder konstant (42,5 ± 2%). Dies zeichnet das erfindungsgemäße Verfahren im Vergleich zu den bisher bekannten Verfahren besonders aus. Wenn die Freisetzungsrate bei einem Protein oder Antigen evaluiert wurde und diese so konstant ist wie beim erfindungsgemäßen Verfahren, weiters der ungebundene Anteil bekannt ist, kann die tatsächliche Gesamtmenge jederzeit berechnet werden. Dies ist mit bisher beschriebenen Verfahren bei allen Antigenen, die teilweise oder gesamt in gebundener Form als Immunkomplexe oder Proteinkomplexe vorliegen, nicht gesichert möglich. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse vom SOD-Gehalt der getesteten Sera, die Wiederfindung nach der Immunkomplex-Bildung und nach Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren (30 min. Inkubation bei 67 °C) dargestellt. Die Ergebnisse in Zellkulturmedium sind analog.

Tabelle 3

Serum Nr.	CuZn-SOD-Gehalt in ng/ml Serum	% CuZn-SOD Wiederfindung nach Immunkomplexbildung	% CuZn-SOD Wiederfindung nach Immunkomplexbildung 30 min. bei 67 °C, (erfindungsgemäß)
1	18,8	0	40,6
2	17,6	0	41,3
3	28,4	0	42,5
4	51,2	0	44,8
5	47,6	0	44,1

5.2. CuZnSOD ELISA Testschema:

Der Testaufbau des verwendeten Double Antibody Sandwich ELISAs wird in Fig. 7 gezeigt.

Verwendete Chemikalien:

$NaHCO_3$, Na_2CO_3 , $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 , KCl und NaCl von Fa. Merck, Tween 20® (oder Triton X-100®) von Fa. Serva, BSA (Bovine Serum Albumine) von Fa. Hämosan, pNP (p-Nitrophenyl-Phosphat) von Fa. Sigma.

AT 403 378 B

Verwendete Immunchemikalien:

Fangantikörper: mAb IAM-SOD M05,
Standard CuZn-SOD: Ery-SOD,

- 5 Referenz SOD (Aktivität) Peroxinorm von Fa. Grünenthal, Enzymmarkierter Antikörper: mAb IAM-SOD A11H4xAP

ELISA-Puffer: (Angaben in g/l)

- 10 Beschichtungspuffer:

0,1 N NaHCO_3 -Puffer pH 9,6 bis 9,8

8,4 g NaHCO_3

4,0 g Na_2CO_3

- 15 Haltbarkeit: 1 Woche bei 20 °C

Waschpuffer:

PBS, pH 7,2 bis 7,4

- 20 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 g KH_2PO_4

0,2 g KCl

8,0 g NaCl

1 ml Tween 20®

- 25 Haltbarkeit: 1 Tag bei 20 °C

Verdünnungspuffer:

Waschpuffer + 1 % BSA

- 30 Haltbarkeit: 1 Tag bei 20 °C

Färbereagenzien für Alkalische Phosphatase:

Färbepuffer:

- 35 0,1 N NaHCO_3 -Puffer pH 9,6 bis 9,8

8,4 g NaHCO_3

4,0 g Na_2CO_3

Haltbarkeit: 1 Woche bei 20 °C

- 40 Färbelösung:

mg/ml Färbepuffer

a) 1 mg pNP (p-Nitrophenyl-Phosphat)

Haltbarkeit: 1 h lichtgeschützt

- 45

5.3. Durchführung:

1. MAb IAM-SOD M05 whole molecule wird 1:100 in Beschichtungspuffer aufgetragen (100 μl /Well, 2 μg IgG/ml) und mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C abgedeckt inkubiert.
- 50 2. Die Platten werden anschließend mindestens 3x mit Waschpuffer gewaschen.
3. 50 μl der Proben- und Standardverdünnungen (50 - 0,391 ng CuZn-SOD/ml) werden von der Verdünnungsplatte auf die Testplatte übertragen (Reaktionsblindwert = 50 μl Verdünnungspuffer) und 1h abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Die Platten werden anschließend mindestens 3x mit Waschpuffer gewaschen.
- 55 5. 50 μl /Well mAb IAM-SOD A11H4xAP markiert (1:2000 verdünnt in Proben-Verdünnungspuffer) werden aufgetragen und 1h abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Die Platten werden anschließend mindestens 3x mit Waschpuffer gewaschen.
7. 100 μl /Well Färbelösung auftragen und Standardreihen ausdifferenzieren lassen.

8. Die Platten im Photometer messen (nach 30 min und nach 60 min), über einen angeschlossenen Computer die Meßdaten auswerten.

Meßwellenlänge: 405 nm

Referenzwellenlänge: 620 nm (oder 690 nm).

5

Patentansprüche

1. Reagens zur Freisetzung von thermostabilen Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Natriumdodecylsulfat (SDS) und Diethylentriamin-pentaessigsäure (DETAPAC) oder ein Salz hiervon als Chelatbildner umfaßt.
2. Reagens nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Natriumdodecylsulfat (SDS) und der Chelatbildner in einem Masseverhältnis von 4 : 1 oder höher vorhanden sind.
3. Reagens nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß Natriumdodecylsulfat (SDS) und der Chelatbildner in wässriger Lösung vorliegen.
4. Verfahren zur Freisetzung von thermostabilen Antigenen oder DNA und RNA aus Komplexen bzw. Zellen und Viren in einer Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Probe mit dem Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gemischt, erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pH der Reaktionslösung auf 7,0 bis 7,4 eingestellt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die thermische Behandlung bei einer Temperatur von 60 bis 100 °C während 3 bis 60 Minuten erfolgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Probe mit dem Reagens in einem Volumsverhältnis von etwa 1 : 2 gemischt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration von Natriumdodecylsulfat (SDS) und dem Chelatbildner durch Verdünnen des Reagens an die Proteinkonzentration der Probe angepaßt wird.
9. Verwendung des Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8.

Hiezu 7 Blatt Zeichnungen

40

45

50

55

% p24 Wiederfindung nach Behandlung mit verschiedenen Methoden

Fig. 1:

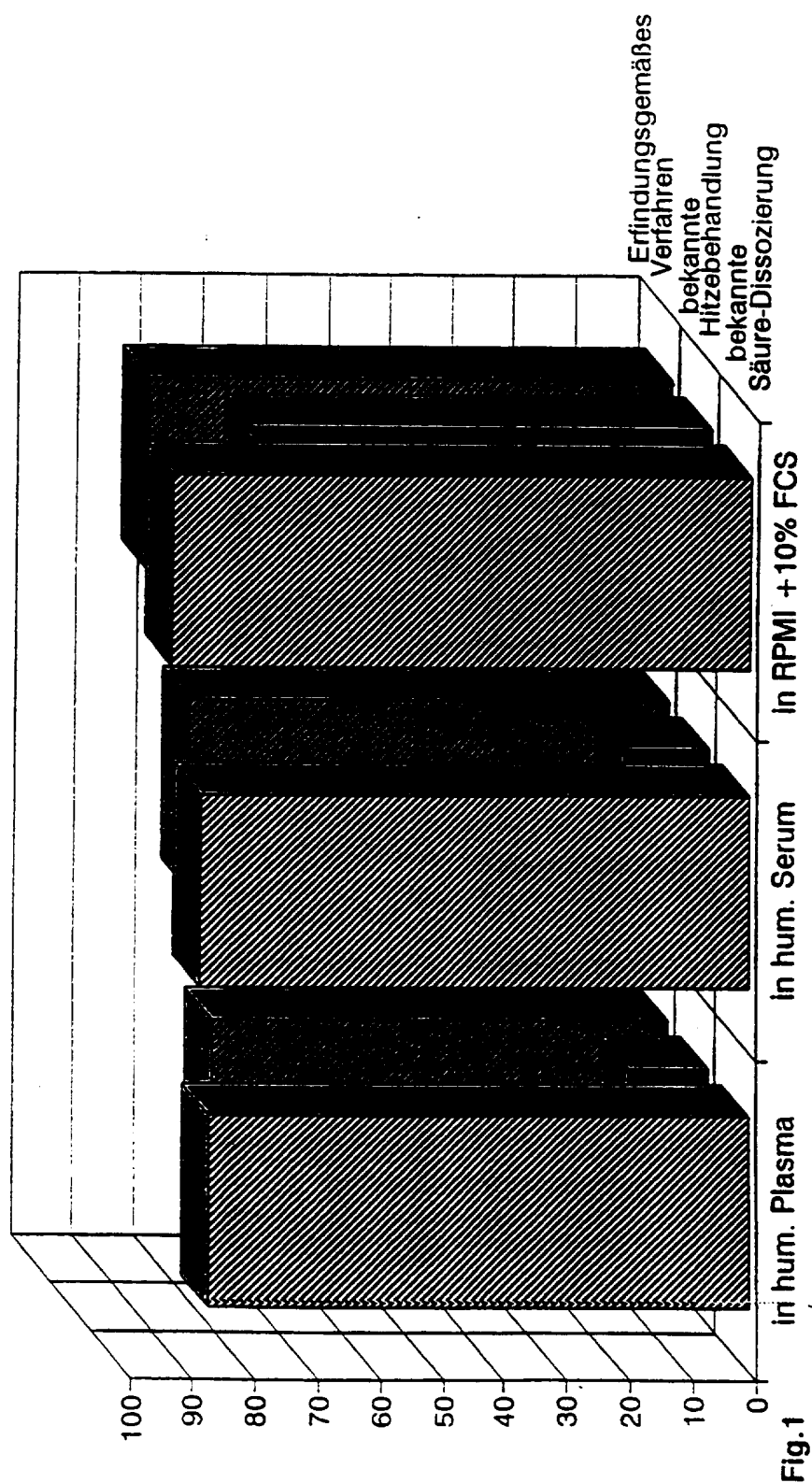
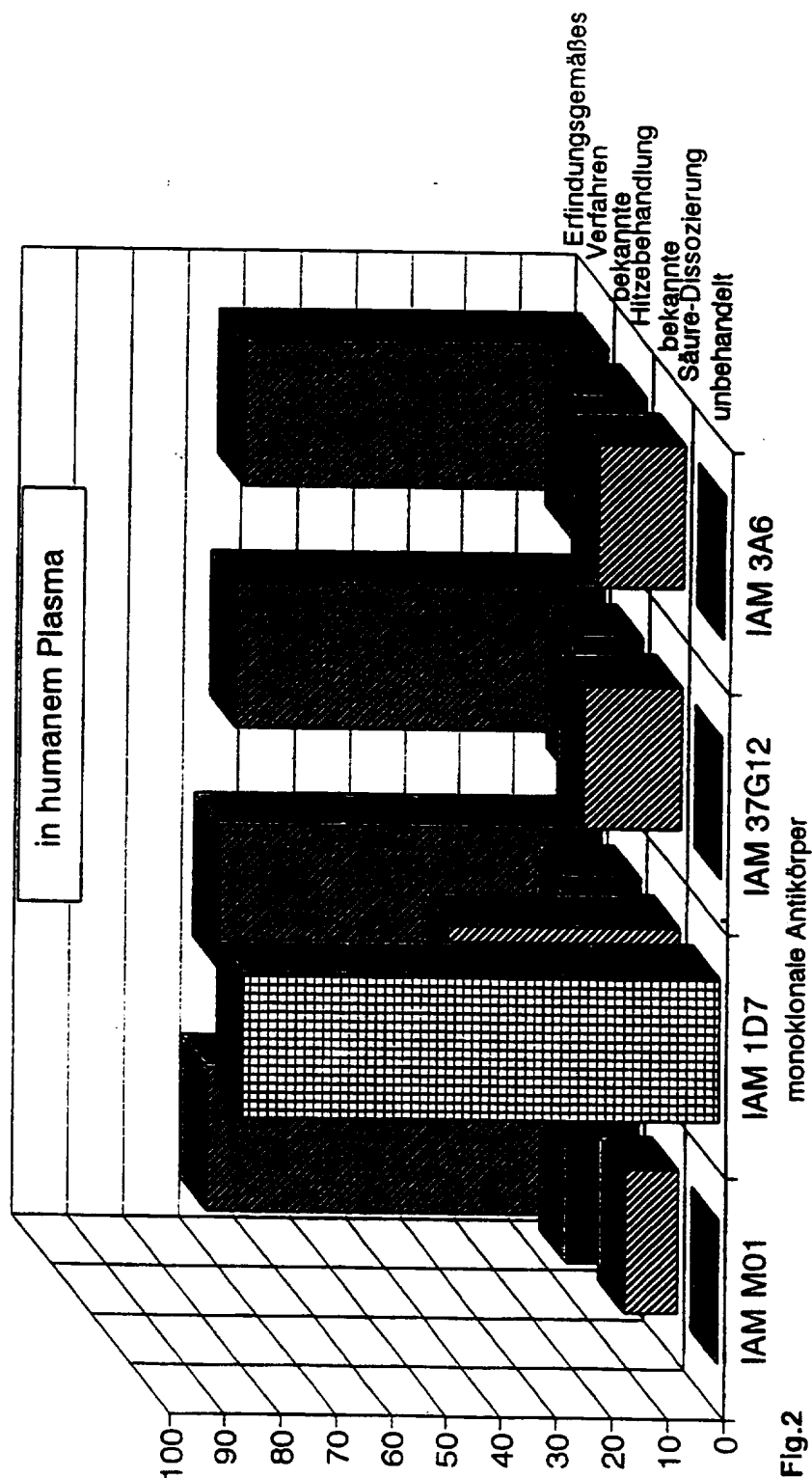


Fig.1

% p24 Wiederfindung aus Immunkomplexen bezogen auf unbehandelten p24 Standard

Fig. 2:



% p24 Wiederfindung aus Immunkomplexen bezogen auf unbehandelten p24 Standard

Fig. 3:

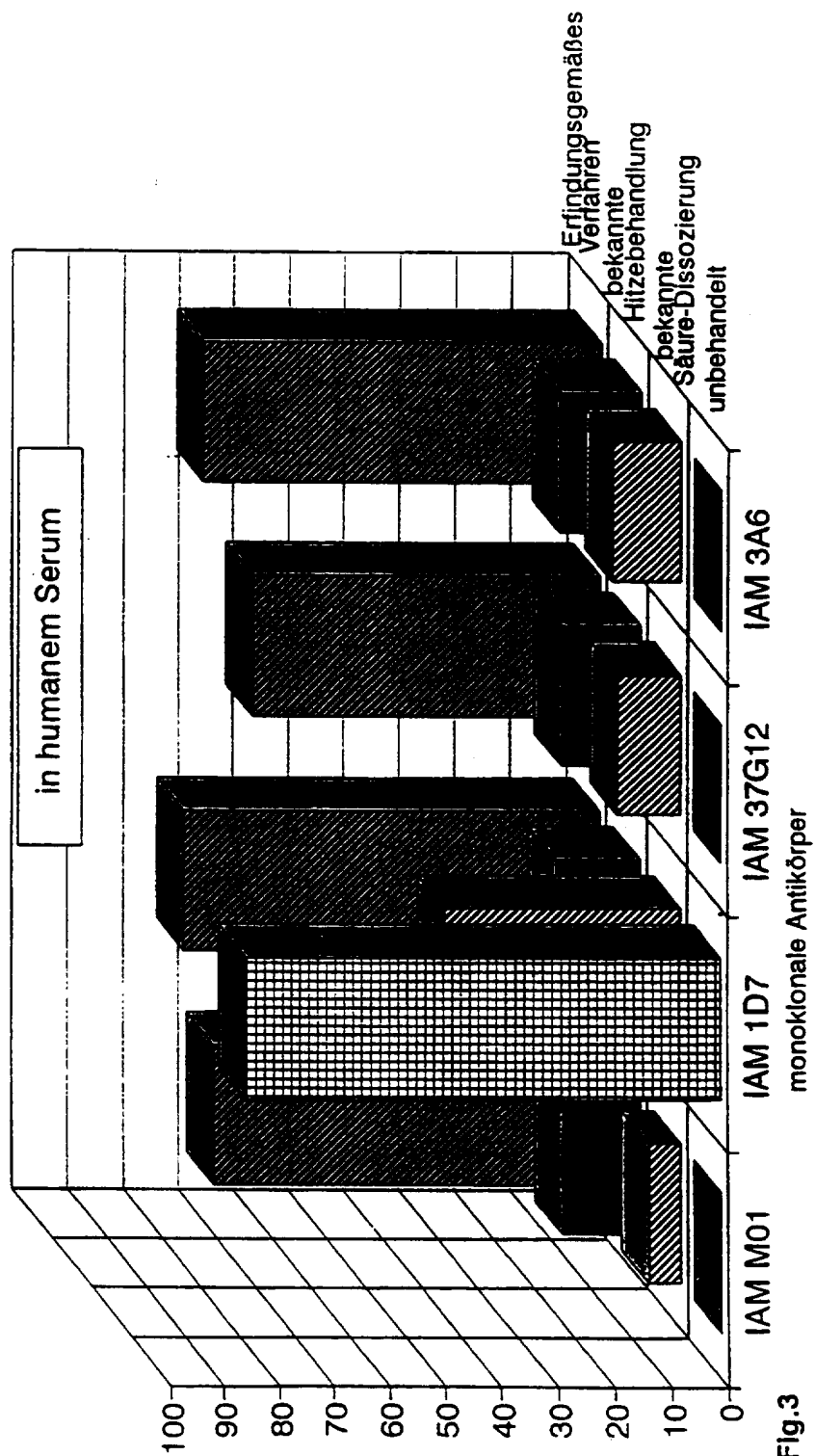


Fig.3

% p24 Wiederfindung aus Immunkomplexen bezogen auf unbehandelten p24 Standard

Fig. 4:

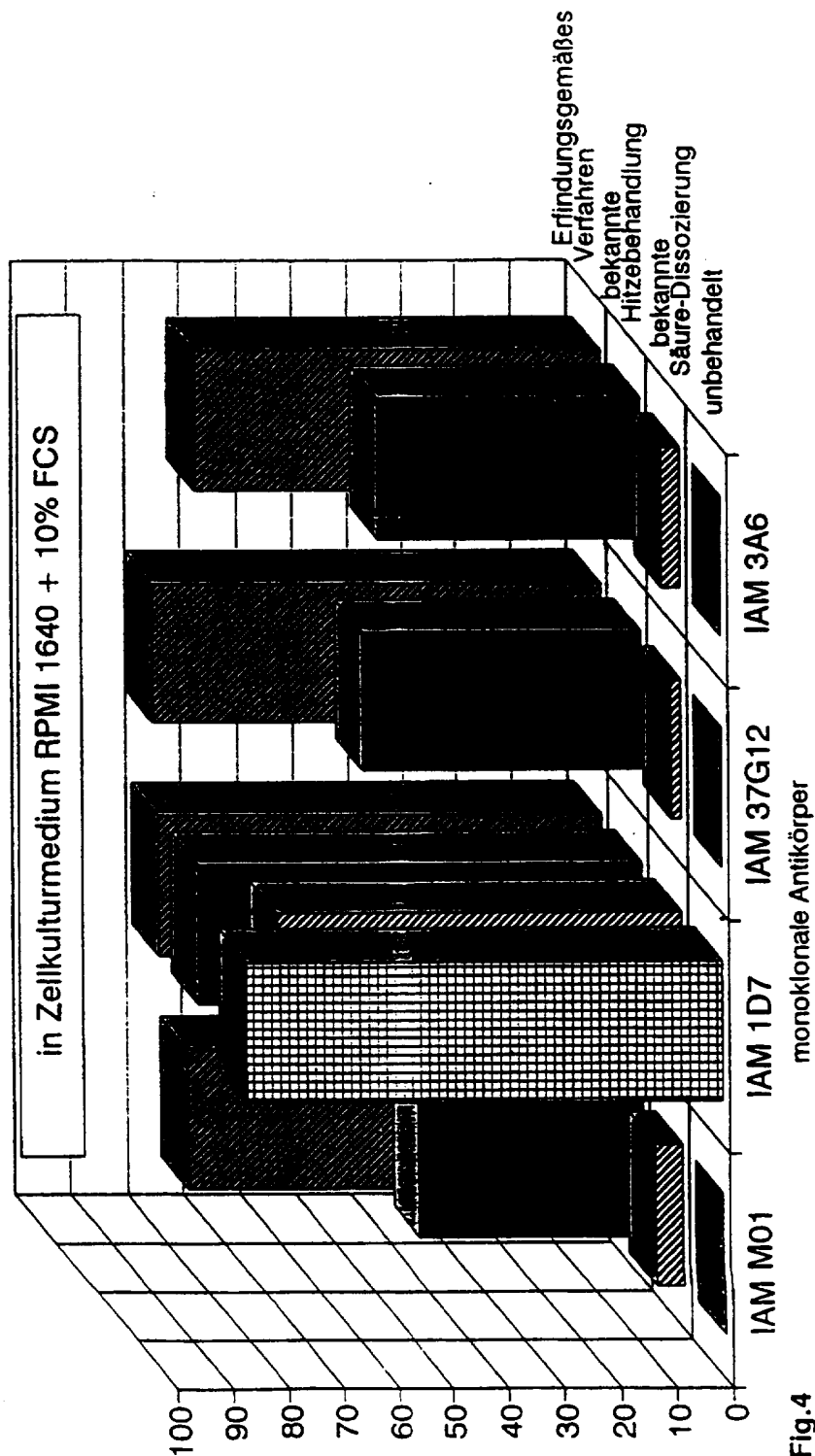


Fig.4

Fig. 5 :
 % p24 Wiederfindung aus Immunkomplexen
 mit dem bekannten Säure-Dissoziierungsverfahren
 bezogen auf gleichbehandelten p24 Standard

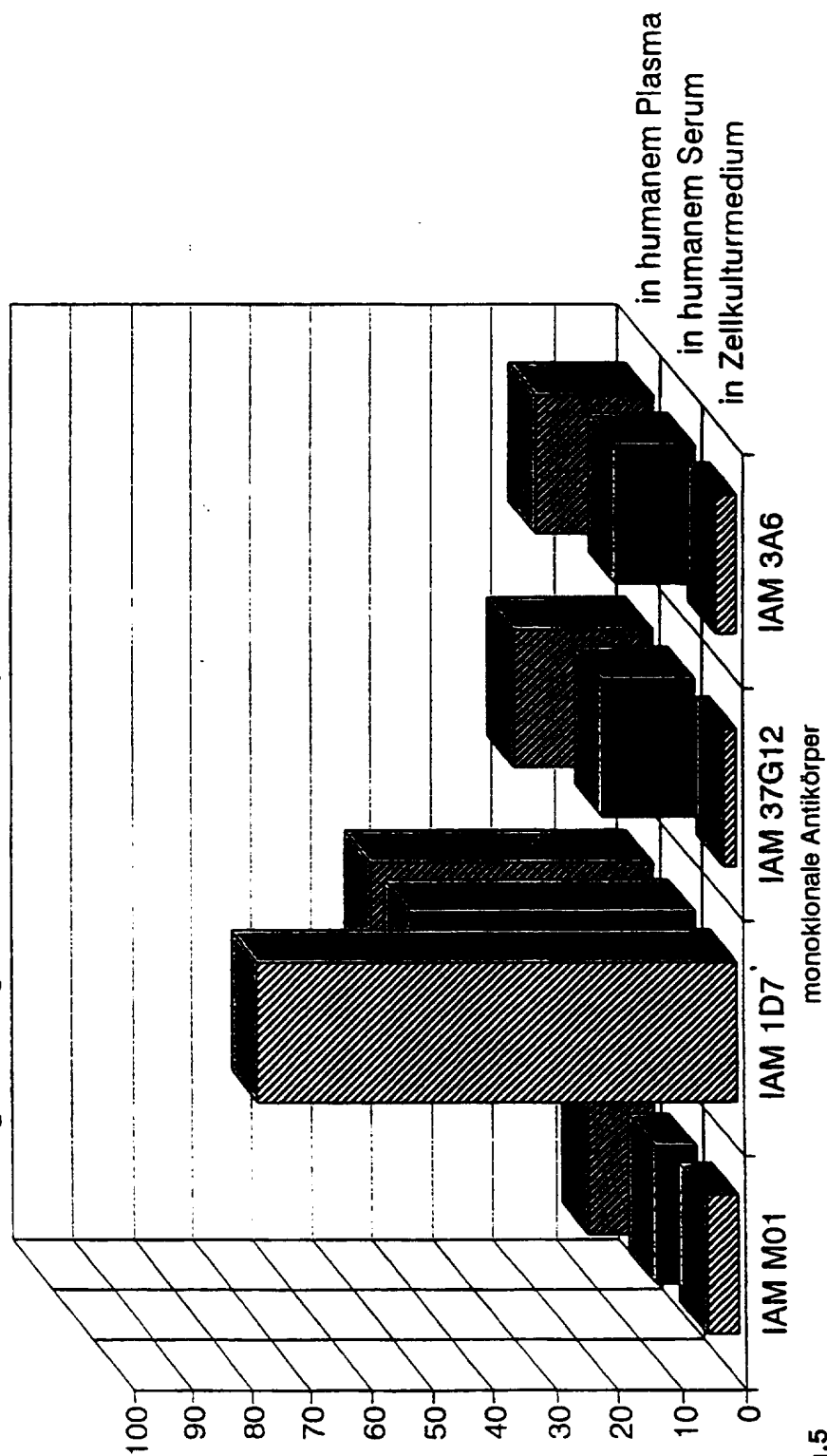


Fig.5

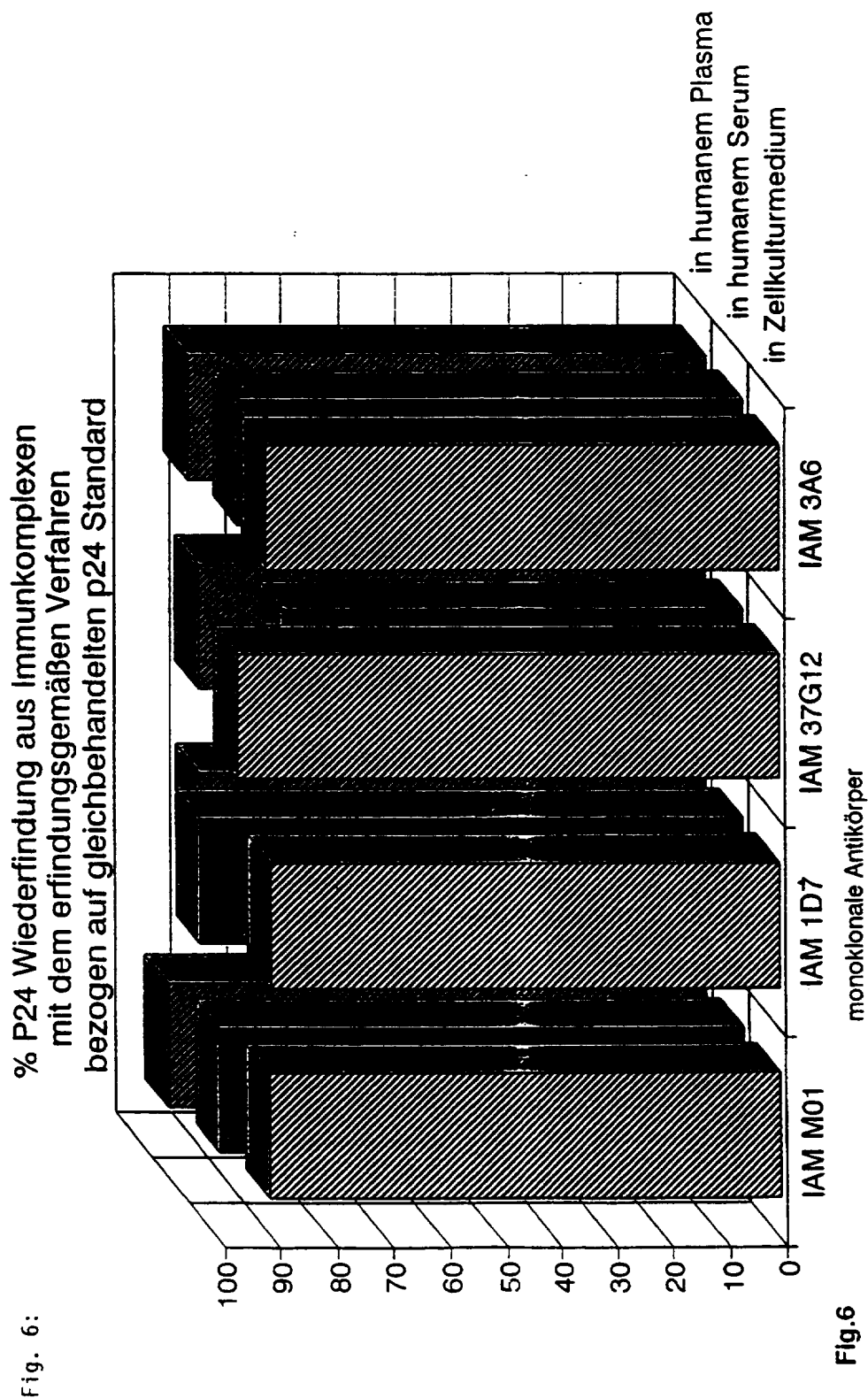


Fig. 7:

