



Republik  
Österreich  
Patentamt

(11) Nummer: **AT 397 580 B**

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2616/87

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : **G01N 33/543**  
G01N 33/541, 33/531

(22) Anmeldetag: 8.10.1987

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 9.1993

(45) Ausgabetag: 25. 5.1994

(30) Priorität:

13.11.1986 DE 3638767 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

CHEM.ABSTR. 101, 1984, S. 304, ZUSAMMENFASSUNG NO.  
106 741M

(73) Patentinhaber:

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT  
D-3550 MARBURG (DE).

(54) **LAKTOFERRIN ENTHALTENDES INKUBATIONSMEDIUM FÜR FESTPHASEN-IMMUNOMETRISCHE VERFAHREN UND SEINE VERWENDUNG**

(57) Es werden Inkubationsmedien für festphasen-immunometrische Tests beschrieben, die Laktoferrin enthalten. Diese Inkubationsmedien haben den Vorteil gegenüber den bisher verwendeten Medien, daß sie besonders auch im Falle der Verwendung von erhitztem Probenmaterial in den Tests verfälschte Ergebnisse bei der Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern verhindern.

AT 397 580 B

Die Erfindung betrifft ein Laktoferrin enthaltendes Inkubationsmedium für festphasen-immunometrische Tests und die Verwendung dieses Mediums.

Für festphasen-immunometrische Tests, beispielsweise ELISA, müssen die erforderlichen Inkubationsmedien ("Pufferlösungen", "Inkubationsmilieus") so zusammengesetzt sein, daß die unspezifische Bindung von Begleitsubstanzen der Probe an die Festphase verhindert wird. Dafür bekannte Zusätze sind Proteine wie Albumin, Kasein, Gemische von Proteinen wie tierische Seren, hydrolysierte Gelatine oder deren Derivate, sowie Tenside.

Mit solchen Zusätzen versehene Inkubationsmedien können falsche Meßwerte nicht verhindern, die besonders beobachtet werden, wenn Proben erhitzt worden sind. Das Erhitzen ist zweckmäßig, um die Infektiosität der Proben herabzusetzen, die beispielsweise durch HIV (humanes Immundeficiency Virus) gegeben sein kann.

Es bestand daher die Aufgabe, ein Inkubationsmedium zu finden, bei dessen Verwendung durch Erhitzen der Probe verursachte falsche Werte nicht auftreten.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß ein Inkubationsmedium, das Laktoferrin enthält, diese Aufgabe löst.

Gegenstand der Erfindung ist ein Inkubationsmedium für festphasen-immunometrische Tests enthaltend Laktoferrin.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung von Laktoferrin in einem Inkubationsmedium, das bei einem festphasen-immunometrischen Test verwendet wird.

Ein Inkubationsmedium im Sinne der Erfindung ist die flüssige Phase eines festphasen-immunometrischen Test, in der die immunchemische Reaktion abläuft.

Laktoferrin wird in einer Konzentration von 0.05 bis 20 g/l zugegeben. Bevorzugt wird eine Konzentration von 0.15-0.25, besonders 0.2 g/l.

Das Laktoferrin kann an sich bekannten Inkubationsmedien oder Pufferlösungen für festphasen-immunometrische-Tests zugesetzt werden. Eine davon ist beispielsweise in DE-A-27 448 36 auf Seite 24 beschriebene Lösung, die außer Puffersubstanz 5 g/l Rinderserumalbumin, 5 g/l Polyoxiethylen-(20)-sorbitanmonolaureat (<sup>(R)</sup>Tween 20) in phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) enthält. Als weiteres Beispiel sei die in DE-A-31 15 115 auf Seite 10 beschriebene Lösung angeführt, ein 0.2 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 6.5, der 2 g/l Rinderserumalbumin und 200 ml/l normales Ziegenserum enthält. Eine bevorzugte Pufferlösung ist im Beispiel verwendet.

Ein solches Medium kann vorteilhaft ein an sich bekanntes Protein, vorzugsweise Kasein, und/oder ein Hydrolyseprodukt von Gelatine oder hydrolysierte und chemisch behandelte Gelatine enthalten.

Das erfindungsgemäß zu verwendende Laktoferrin ist erhältlich aus Milch eines Säugers, indem die Milch entrahmt, die entrahmte Milch auf einen pH-Wert von 3.5 - 4.5 eingestellt, die entstandene Proteinfällung abgetrennt und aus dem Überstand das Laktoferrin durch Chromatographie an einem Ionenaustauscher abgetrennt und isoliert wird.

Laktoferrin wird aus Milch, vorzugsweise aus Kuhmilch isoliert. In einem bevorzugten Verfahren zur Gewinnung eines für den erfindungsgemäßen Zweck geeigneten Laktoferrins wird die Milch entfettet, indem sie beispielsweise zentrifugiert wird. Von den sich bildenden zwei Phasen wird die obere abgetrennt und verworfen. Die untere Phase wird mit einer Säure auf pH 3.5-4.5 eingestellt. Dabei entsteht ein Präzipitat, welches beispielsweise durch Zentrifugation sedimentiert wird und verworfen wird. Der Überstand wird durch Verdünnen mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6-7 mS/cm eingestellt. Dann wird gequollener und mit einem Puffer von pH 4-5.5 und einer Leitfähigkeit von vorzugsweise 6-7 mS/cm equilibrierter Kationenaustauscher, beispielsweise CM-Zellulose oder SP-<sup>R</sup>Sephadex, eingetragen. Die Suspension wird filtriert und der Rückstand mehrmals mit demselben Puffer gewaschen, dann darin suspendiert und in eine Säule gepackt. Es wird mit einem Gradienten von vorzugsweise 0-1 mol/l NaCl bei pH 5 eluiert. Die Fraktion, die im Bereich von 500-650 mmol/l NaCl als einheitlicher bei 280 nm gemessener Peak eluiert wird, enthält das für das Inkubationsmedium besonders geeignete Laktoferrin. Dieses Laktoferrin erscheint in einer SDS-PAGE Elektrophorese als Bande mit einem Molekulargewicht von 80000±3000.

Bei Chromatographie an einem Anionenaustauscher, beispielsweise an DEAE- oder QAE-<sup>R</sup>Sephadex, oder an DEAE-Zellulose wird der Überstand aus der oben beschriebenen Fällung bei pH 3.5-4.5 auf pH 6.5-7.5 und eine Leitfähigkeit von 6-8 mS/cm eingestellt und auf eine Säule gefüllt mit dem Ionenaustauscher gegeben, der zuvor mit einem Puffer von pH 6.5-7.5 und einer Leitfähigkeit von 6-8 mS/cm equilibriert worden war. Das Laktoferrin erscheint dann im Durchlauf oder es wird als erster Peak bei Elution mit einem NaCl-Gradienten eluiert.

Das Laktoferrin muß bei der Inkubation der Probe, bzw. des Analyten mit den an die Festphase gebundenen Reaktanten vorhanden sein. Es kann der Lösung, die den Analyten enthält oder auch der Lösung, bzw. dem Puffer, mit dem der Analyt verdünnt wird, zugesetzt werden. Es kann aber auch in

gelöster Form mit dem an die Festphase gebundenen Reaktanten in Kontakt gebracht und/oder auf die Festphase getrocknet werden, bevor diese mit dem Analyten in Kontakt gebracht wird.

Als an Festphasen gebundene Reaktanten kommen in Frage die Komponenten eines bioaffinen Bindungssystems, die einen solchen Analyten zu binden vermögen. Im Falle eines immunologischen Bindungssystems sind diese Reaktanten entweder Antigene oder Antikörper. Festphasen-immunometrische Tests können sowohl kompetitive, als auch zweiseiten-immunometrische (Sandwich) oder auch indirekte Tests sein. Im letztgenannten Fall ist der Analyt ein Antikörper, der Festphasenreaktant das entsprechende Antigen, wobei die Menge des an die Festphase gebundenen Antikörpers durch einen zweiten, markierten Antikörper bestimmt wird.

Das Testsystem kann ein Ein- oder Mehrschrittassay sein.

Das Laktoferrin verhindert die Bindung von solchen Bestandteilen der Probe, die nicht zu dem jeweiligen bioaffinen Bindungssystem gehören. Es vermeidet somit falsche Ergebnisse beim Nachweis und bei der Bestimmung des Analyten.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und belegen die Zweckmäßigkeit des Laktoferrin als Bestandteil des Inkubationsmediums.

Die Beispiele sollen zeigen, daß Laktoferrin in verschiedenen Inkubationsmedien in unterschiedlichen Mengen eingesetzt brauchbar ist.

#### Beispiel 1

20

##### 1. Isolierung von Laktoferrin

20 l Kuhmilch wurden 30 min bei 3400xg zentrifugiert, das MilCHFett im Überstand entfernt. Geringe Anteile unlöslicher Bestandteile wurden als Sediment abgetrennt und ebenfalls verworfen.

Der pH-Wert der entfetteten Milch wurde durch Zugabe von Salzsäure auf pH 4.0 eingestellt. Das dabei auftretende Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugieren bei 3400xg entfernt.

Der Überstand, der nach Einstellen von pH 5.0 mit Natronlauge eine Leitfähigkeit von 12 mS/cm bei 20 °C hatte, wurde mit Wasser auf 7 mS/cm verdünnt und dann mit 200 ml des gequollenen Ionenaustauschers Carboxymethylcellulose CM 32 der Fa. Whatmann versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ionenaustauscher war vorher mit 50 mmol/l Natriumacetatpuffer, pH 5.0 equilibriert worden. Anschließend wurde der Ionenaustauscher über eine Filternutsche abfiltriert und in dem Natriumacetatpuffer suspendiert und in eine Chromatographiesäule überführt. Die Säule wurde anschließend mit 400 ml des vorher beschriebenen Acetatpuffers gespült. Die an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine wurden mit einer Lösung von 1 mol/l Natriumchlorid eluiert.

Das Eluat wurde mit 1 normaler Natronlauge auf pH 5.0 eingestellt und durch Dialyse in 50 mmol/l Natriumacetat, pH 5.0 überführt. Das Proteingemisch wurde anschließend an 200 ml Carboxymethylcellulose CM 32 rechromatographiert. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen linearen Gradienten, der von 50 mmol/l Natriumacetat pH 5 bis 50 mmol/l Natriumacetat, pH 5 und 1 mol/l Natriumchlorid reichte.

Der 4. Peak des Elutionsdiagrammes, dessen Lösung eine Leitfähigkeit von 18-20 mS/cm hatte, wurde als eine Fraktion gesammelt, durch Ultrafiltrieren konzentriert und an <sup>R</sup>Sepharose AcA 34 gefiltriert, die mit PBS enthaltend 0.5 g/l Natriumazid equilibriert war. Die 1.2 g Protein ausmachende Hauptkomponente der Gelfiltration enthielt das Laktoferrin.

##### 2. Vergleich von Probenverdünnungspuffer enthaltend Laktoferrin mit Probenverdünnungspuffer ohne Zusatz

45

Für das festphasen-immunometrische Verfahren wurde das ELISA-Bestock Enzygnost<sup>R</sup> Anti HSV der Behringwerke verwandt. Bei der Testdurchführung wurde der in der Packungsbeilage beschriebenen Arbeitsweise gefolgt, die wie folgt kurz dargestellt ist.

Die Proben wurden mit Probenverdünnungspuffer (137 mmol/l NaCl, 7.247 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O und 2.720 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit den Zusätzen von 2.7 mmol/l KCl, 0.4 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 3 mmol/l NaN<sub>3</sub>, 10 ml/l foetalem Kälberserum und 40 ml/l <sup>(R)</sup>Tween 20) ohne oder mit Zusatz von 0.2 g/l Laktoferrin im Verhältnis 1:25 anstatt wie empfohlen 1:44 verdünnt und mit in dem Nöpfchen einer Mikrottestplatte fixierten Antigenen zur Inkubation gebracht, die nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen, über eine Konjugatlösung ein Enzym an den gebildeten Antikörper/Antigen-Komplexen gebunden, die überschüssige Konjugatlösung ausgewaschen, mittels einer chromogenen Substratlösung die Einfärbung über das Enzym bewirkt und anschließend mit einer Stopp-Lösung die Reaktion beendet. Die so hergestellten, in Abhängigkeit vom Gehalt der virusspezifischen Antikörper eingefärbten Proben wurden dann bewertet, indem ihre Extinktion

(E) photometrisch bei 405 nm bestimmt wurde.

Jeweils ein Teil von 9 Probandenseren wurde 30 min auf 56 °C erhitzt. Der andere Teil blieb unbehandelt.

Es wurde gefunden, daß bei erhitzten Proben in Verdünnungspuffer ohne Laktoferrin vor allem sehr hohe Extinktionen in den Kontroll-Näpfchen gemessen wurden, aber auch erhöhte Extinktionen in den antigen-beschichteten. Dies führte zu 5 falsch-negativen Ergebnissen. Die Kontroll-Näpfchen sind mit der Präparation nicht virusinfizierter Zellen, die für die Gewinnung der Viren verwendet werden, behandelt ("beschichtet"). Wenn die 9 erhitzten Proben unter Verwendung des Laktoferrin enthaltenden Verdünnungspuffers getestet wurden, wurde kein falsch-negativer Wert gefunden. Die nicht erhitzten Proben wurden unter Verwendung des laktoferrinfreien Verdünnungspuffers geprüft. Die Ergebnisse dienten als Kontrolle der Ergebnisse mit den erhitzten Seren.

#### Beispiel 2

Die Wirkung eines Zusatzes von Laktoferrin wurde in einem Einschritt-Sandwich-Test geprüft. Wenn in einem solchen Test für HBsAg 7,5 g/l Laktoferrin zugegeben wurde, wurden alle von 14 nichterhitzten kritischen Proben richtig negativ gefunden, während ohne Zusatz von Laktoferrin alle als falsch positiv bestimmt worden waren.

#### Beispiel 3

Die Wirkung eines Zusatzes von Laktoferrin wurde in einem Dreischritt-Sandwich-Test zum Nachweis von Influenza A-Antigen geprüft. Laktoferrin wurde im zweiten und dritten Schritt dieses festphasen-immunochemischen Verfahrens eingesetzt.

Wenn in diesen beiden Schritten, bei denen zuerst ein gebrauchsverdünntes Antikörper/Biotin-Konjugat und danach ein gebrauchsverdünntes Streptavidin/POD-Konjugat, enthaltend Laktoferrin (mehr als 0,05 g/l), inkubiert wurden, ließen sich die unspezifischen Reaktionen bezüglich Background und Influenza B-Fremdantigen um über 80 % senken. Stellvertretend ist hier ein ELISA-Ergebnis angeführt, gemessen bei 450 nm:

Unspezifische Bindung ohne Laktoferrin = 2,892 E.  
Unspezifische Bindung mit Laktoferrin = 0,231 E.

#### **Patentansprüche**

1. Inkubationsmedium für festphasen-immunometrische Tests enthaltend Laktoferrin.
2. Inkubationsmedium nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Laktoferrin in dem Konzentrationsbereich von 0.05 - 20 g/l vorliegt.
3. Inkubationsmedium nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Laktoferrin enthält, das erhältlich ist aus Milch eines Säugers, indem
  - a) die Milch entrahmt,
  - b) die entrahmte Milch auf einen pH-Wert von 3.5 - 4.5 eingestellt,
  - c) die bei (b) entstehende Proteinfällung abgetrennt
 und
  - d) aus dem bei (c) entstehenden Überstand das Laktoferrin durch Chromatographie an einem Ionenaustauscher abgetrennt und isoliert wird.
4. Inkubationsmedium für festphasen-immunometrische Tests enthaltend ein Puffersalz, Laktoferrin und gegebenenfalls ein Protein und gegebenenfalls ein Tensid und gegebenenfalls ein Neutralsalz.
5. Inkubationsmedium für festphasen-immunometrische Tests enthaltend ein Puffersalze, Laktoferrin, Rinderserumalbumin, ein Tensid und gegebenenfalls ein Neutralsalz.
6. Inkubationsmedium für festphasen-immunometrische Tests enthaltend ein Puffersalz, Laktoferrin, ein Hydrolyseprodukt von Gelatine oder hydrolysierte und chemisch behandelte oder chemisch behandelte und hydrolysierte Gelatine und ein Tensid und gegebenenfalls ein Neutralsalz.

7. Verwendung von Lactoferrin in einem festphasenimmunometrischen Test.
8. Verwendung eines Inkubationsmediums nach Anspruch 1 in festphasen-immunometrischen Tests zum Nachweis und zur Bestimmung eines Antikörpers in einer biologischen Flüssigkeit, die erhitzt worden war.
9. Verwendung eines Inkubationsmediums nach Anspruch 1 in festphasen-immunometrischen Tests zum Nachweis und zur Bestimmung eines Antigens in einer biologischen Flüssigkeit, die erhitzt worden war.
10. Verwendung eines Inkubationsmediums nach Anspruch 1 in festphasen-immunometrischen Tests zum Nachweis und zur Bestimmung eines Antikörpers oder eines Antigens in einer biologischen Flüssigkeit, die aggregierte Bestandteile in gelöster Form enthält.