



(19) österreichisches
patentamt

(10) **AT 413 768 B 2006-05-15**

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 659/2004 (51) Int. Cl.⁷: **G01N 33/531**
(22) Anmeldetag: 2004-04-16 G01N 33/68, 33/536, 33/559
(42) Beginn der Patentdauer: 2005-09-15
(45) Ausgabetag: 2006-05-15

(30) Priorität:
29.07.2003 AT A 1201/03 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:
KURKI P, ET AL. "ANTIBODIES TO
CYTOPLASMIC."
J RHEUMATOL. 1983 AUG;10(4):558-62
WO 1999/28344A2
MENARD HA, ET AL. "INSIGHTS INTO
RHEUMATOID ARTHRITIS DERIVED
FROM THE SA IMMUNE SYSTEM"
ARTHRITIS RES. 2000;2(6):429-32
EPUB 2000 AUG 17
VAN BOEKEL MA, ET AL.
"AUTOANTIBODY SYSTEMS IN
RHEUMATOID.. " ARTHRITIS RES.
2002; 4(2):87-93. EPUB 2001 NOV 06,
INTERNETVERÖFFENTLICHUNG

(73) Patentinhaber:
HERKNER KURT DIPL.ING. DR.TECHN.
A-1140 WIEN (AT).

(56) Entgegenhaltungen:
[HTTP://ARTHRITIS-RESEARCH.COM/
CONTENT/4/2/87](http://arthrititis-research.com/content/4/2/87) *FIGUR 1, SEITE 91,
1. SPALTE, 2. ABSATZ; SEITE 92,
1. SPALTE, ZEILEN 5 BIS 8*

(54) **BIOCHEMISCHES DIAGNOSTIKUM ZUR ERKENNUNG RHEUMATOIDER ARTHRITIS**

(57) Biochemisches Diagnostikum zur Erkennung von Rheumatoider Arthritis (RA), insbesondere bei Kindern (Juvenile idiopathische Arthritis-JIA) und bei Erwachsenen (chronische Polyarthritis-cP) aus dem Blut (Serum), dadurch gekennzeichnet, dass es eine Kombination natürlicher oder rekombinanter Proteine, bestehend aus α/β -Tubulin und Desmin, gegebenenfalls zusätzlich mit nativem Vimentin tierischer Herkunft (Rind), das nicht citrulliert ist, enthält.

Das Diagnostikum kann auch Bruchstücke von α/β -Tubulin und Desmin mit einem Molekulargewicht ≥ 13 kDa, hergestellt durch Abbaureaktionen mittels proteolytischer Enzyme enthalten.

Das Diagnostikum enthält vorzugsweise eine Kombination in einem Mischungsverhältnis von 50 bis 80 % α/β -Tubulin und 20 bis 50 % Desmin.

Das Diagnostikum liegt zweckmäßiger Weise in auf eine Festphase aufgebracht Form vor, die eine Kavität einer Mikrotiterplatte (ELISA) oder zur Anwendung der Blot- oder Streifentechniken Membranen sind.

AT 413 768 B 2006-05-15

DVR 0078018

Die Erfindung betrifft ein biochemisches Diagnostikum zur sicheren Erkennung von Rheumatoider Arthritis (Kurzbezeichnung: RA) aus dem Blut (Serum), insbesondere zur Anwendung in einem laborchemischen Diagnoseverfahren. Die Erfindung betrifft insbesondere ein Diagnostikum zur Erkennung der RA bei Kindern (juvenile idiopathische Arthritis-JIA) und bei Erwachsenen (chronische Polyarthritis-cP).

Stand der Technik

Die z.Z. verwendeten Tests im Bereich der Rheuma-/Arthritis-Diagnostik sind hauptsächlich folgende:

a) klassischer Rheumafaktor: die Bestimmung eines Autoantikörpers vom Typ Immunglobulin-M (IgM), gegen körpereigenes Immunglobulin-G (IgG). Die Analysenmethode ist vorzugsweise die Nephelometrie und der ELISA (= Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Ferner gibt es noch Immundiffusions- und koagulometrischen Techniken.

b) Rheumafaktoren, bei denen Autoantikörper aller drei Isotypen (IgG, IgA und IgM) gegen das körpereigene IgG mittels ELISA Technik bestimmt werden.

c) Bestimmung der Autoantikörper vom IgG-Typ gegen Zytokeratin(e) mittels indirekter Immunfluoreszenz auf modifizierten HEp-2 Zellen.

d) Bestimmung von Autoantikörpern (vom IgG-Typ) gegen das Protein „RA33“ mittels ELISA

e) Bestimmung von Autoantikörpern (vom IgG-Typ) gegen citrullinierte, cyclische Peptide (CCP) mittels ELISA. Eine solche Methode ist in der WO 1999/28344 A2 geoffenbart, bei der primär Antikörper bestimmt werden, die in dem Intermediärfilament Vimentin die Aminosäure Citrullin (entstanden durch Deiminierung von Arginin) und distinkte, das Citrullin umgebende Aminosäuresequenzen erkennen. Durch diese Umwandlung des natürlichen Vimentins wird „in vivo“ die Verknüpfung mit bestimmten Cytokeratinen getriggert (auch beschrieben als Sa-Immunsystem oder „hapten-carrier“ System).

f) Bestimmung von Autoantikörpern (vom IgG-Typ) gegen das Protein Filaggrin mittels ELISA.

Alle unter a) bis f) beschriebenen Diagnosemethoden sind laut wissenschaftlichen Publikationen mit großen Schwankungsbreiten von Sensitivität und Spezifität behaftet und sind vor allem nicht für die labordiagnostische Erkennung des *kindlichen Rheumas (JIA)* geeignet.

(Statistik Austria, 2004: die Population der 0-15 Jährigen beträgt in Österreich 16,6% der Gesamtbevölkerung, hochgerechnet auf die Gruppe der 0-20 Jährigen sind dies etwa 20%, die von den bisher beschriebenen Assays nicht erfasst werden können).

Beschreibung der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist nun die Schaffung eines Diagnostikums zur Erkennung der Rheumatoiden Arthritis (RA), insbesondere der Juvenilen Idiopathischen Arthritis-JIA und bei Erwachsenen der chronischen Polyarthritis-cP, aus dem Blut (Serum), welches Diagnostikum einerseits in wenig aufwendiger und kostengünstiger Weise zur Verfügung gestellt werden kann und mittels welchem andererseits in einfacher und unkomplizierter Weise eine Durchführung von Tests im Bereich der Rheuma-/Arthritis-Diagnostik gewährleistet ist. Grundlage des Verfahrens ist die Verwendung einer neuen Proteinkombination, die mit den spezifischen Antikörpern vom Typ Immunglobulin-G (IgG) aus dem Blut von RA-Patienten, so genannten Autoantikörpern, eine Bindung eingeht, d.h. einen Protein-Antikörper Komplex bildet, dessen Menge einen Rückschluss auf Art und Schweregrad der Erkrankung erlaubt.

Die Lösung der gestellten Aufgabe besteht gemäß vorliegender Erfindung darin, dass das Diagnostikum eine Kombination natürlicher oder rekombinanter Proteine, bestehend aus α/β -Tubulin und Desmin, gegebenenfalls zusätzlich mit nativem Vimentin tierischer Herkunft (Rind), das nicht citrulliert ist, enthält.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Diagnostikums liegt darin, dass der so gebildete Protein-Antikörper Komplex, bzw. dessen Quantifizierung einen genauen Rückschluss auf Art und Schwere (der „Aktivität“) der Erkrankung erlaubt, womit auch eine Einschätzung des Therapieerfolges möglich wird. Von besonderem Vorteil ist die Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Diagnostikums in der pädiatrischen Rheumatologie, i.e. eine Ausweitung des diagnostizierbaren Anwendungsbereichs um etwa 20 %, gemessen am Bevölkerungsanteil der 0 bis 20-Jährigen. In diesem Zusammenhang müssen drei Faktoren betont werden, welche den hohen Nutzen und Vorteil des erfindungsgemäßen Diagnostikums eindeutig belegen:

1. Die Verwendung einer spezifischen Proteinkombination, deren Grundsubstanz das Nicht-Intermediärfilament Tubulin ist, das immer mit Desmin kombiniert wird, und gegebenenfalls zusätzlich mit Vimentin.
2. Die Anwendbarkeit des Diagnostikums in der pädiatrischen Rheumadiagnostik
3. Die Möglichkeit der Quantifizierung des Schweregrades der Krankheit und damit auch der Feststellung der Therapiewirkung.

Die Erfindung ist ferner in den Unteransprüchen 2 bis 7 und der nachfolgenden Beschreibung näher dargelegt und gekennzeichnet.

Im Weiteren werden noch folgende Kurzbezeichnungen verwendet:

Tubulin: T; Desmin: D; Vimentin: V

Die getesteten, in der Routineanalytik einsetzbaren *Analysenverfahren* zur Erzielung eines auswertbaren Protein-Antikörper Komplexes sind:

Festphasenmethoden (Proteine sind fixiert), wie z.B. ELISA oder Blot-Techniken (Dot-Blot oder Streifentest) in Kombination mit einer Visualisierung des Immunkomplexes mittels eines zweiten, markierten Antikörpers in Kombination mit einem chromogenen Substrat (übliche Methoden bei ELISA oder Blot Techniken). Bei den für die gegenständliche Anwendung getesteten Analysenverfahren wurden die Proteine in Gesamtproteinkonzentrationen von 0,1 - 1,5 µg/mL (= Coatingkonzentration) verwendet. Das Coating wird in kommerziellen, chemisch aktivierten oder auch unbehandelten Mikrotiterplatten durchgeführt. Für die Blot- oder Streifentechniken werden kommerzielle Membranen verwendet. Die Probeninkubationszeiten sind variabel zwischen 4 und 24 Stunden bei 4° bis 30°C. Die Farbentwicklung wird mittels eines enzymkonjugierten (horseradish-peroxidase) zweiten anti(human)-IgG Antikörpers bewirkt und spektrophotometrisch gemessen. Die gemessenen Extinktionen werden nach Leerwertkorrektur (= Abzug eines Reagentien-Blanks) als „Arbitrary Units“ zur Quantifizierung verwendet.

A) *Das Protein:*

Gegenstand vorliegender Erfindung ist die Verwendung einer Proteinkombination, bestehend aus Tubulin (α/β -Tubulin), kombiniert mit dem Protein Desmin, gegebenenfalls unter Zusatz von Vimentin, zur Erkennung und zum Verlaufsmonitoring der Rheumatoiden Arthritis bei Kindern und Erwachsenen.

Gemäß klinischen Tests ist der gegenständliche Arthritis-Marker bei Verwendung der Proteinkombination, im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen Methoden und den bekannten kommerziellen Tests in der Lage, den aktuellen Status des Patienten (i.e. die Schwere der Krankheit) und den Therapieeinfluss widerzuspiegeln.

Folgende Proteine (natürliche oder rekombinante) werden im beschriebenen Test in Kombination eingesetzt:

Proteinkombination I: α/β -Tubulin (50-80%) + Desmin (20-50%)

Proteinkombination II: α/β -Tubulin (50-80%) + Desmin (20-40%) + Vimentin (5-10%)

[Die Prozentangaben sind Mischungsverhältnisse der Proteine].

- 5 Zur Optimierung der Kombination Tubulin mit Desmin (Proteinkombination I) können die MAPs (Microtubule Associated Proteins) E-MAP-115 und Mapmodulin hinzugefügt werden.

Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Proteinkombination ist das Nicht-Intermediärfilament Tubulin ein integraler Bestandteil neben dem Intermediärfilament Desmin und gegebenenfalls dem Intermediärfilament Vimentin. Wenn Vimentin mitverwendet wird, soll es natives Vimentin tierischer Herkunft (Rind) sein, das nicht citrulliert ist.

Alle beschriebenen Proteine reagieren mit körpereigenem IgG, d.h. sie verbinden sich mit diesem nach dem Prinzip der Protein-Antikörper Reaktion zu einem Immunkomplex, dessen Menge für die Erkennung und Quantifizierung der RA verwendet werden kann. Bei Verwendung der Proteinkombinationen I und II ist der Test aufgrund seiner Sensitivität und Spezifität indikativ für die RA und die JIA, d.h. der Test kann die rheumatoiden Arthritiden von anderen Autoimmunerkrankungen und sonstigen entzündlichen Erkrankungen, speziell aber auch von anderen Krankheiten des rheumatischen Formenkreises, wie z.B. SLE, Kollagenosen, etc., sicher abgrenzen. Auch das unter e) beschriebene Verfahren, das den neuesten Stand der Technik darstellt, versagt völlig bei JIA, wie die rezente Literatur belegt: *Autoimmunity* 35(6), 397-401 (2002), *Annals of the Rheumatic Diseases* 61(7), 608-611 (2002), *Journal of Rheumatology* 30(4), 825-828 (2003).

- 25 Die Unterschiede in der Verwendbarkeit liegen in den diagnostischen Qualitäten, beschrieben durch die Größen „Spezifität“ und „Sensitivität“ (siehe dazu Tabelle 1).

Tabelle 1: Spezifität und Sensitivität des Tests nach klinischer Erprobung bei kindlichen und erwachsenen Patienten und bei gesunden Probanden.

30

	Spezifität [%]	Sensitivität [%]
Proteinkombination I: α/β -Tubulin + Desmin (60/40)	88	95
35 Proteinkombination II: α/β -Tubulin, Desmin, Vimentin (60/30/10)	98	99

Es wird ausserdem noch festgehalten, dass auch Bruchstücke der verwendeten Proteinkombinationen, die aus α/β -Tubulin und Desmin durch Abbaureaktionen mittels proteolytischer Enzyme hergestellt werden und Peptide mit einem Molekulargewicht ≥ 13 kDa enthalten, mit RA-Seren in einem Western-Blot in Sinne des angeführten Diagnostikums qualitativ reagieren.

Bj Die Analysenmethode:

- 45 Zur Quantifizierung des Immunkomplexes können verschiedene immunologische Techniken verwendet werden:

1. Aufbringen (Coating) des Proteins auf eine Festphase.

- 50 Beispiele: i) Mikrotiterplatte (ELISA)
ii) folienartige Trägermaterialien (Blot- oder Streifen-Techniken).

2. Diffusionstechniken.

- 55 Beispiele: i) Ouchterlony Methode

ii) Radiale Immundiffusion.

Die Aufzählung der Anwendungsbeispiele erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die oben angegebenen Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Tests erzielt.

5

C] Anwendungsbeispiel 1:

Quantitativer Antikörper-Nachweis mittels ELISA unter Verwendung von Proteinkombination I:

10 Schritt 1 („Coating“):

Einbringen von 100 µL einer mit einer Proteinkombination I- Lösung mit einer Gesamtprotein-konzentration von 0,2 - 1,5 µg/mL (in einem Coating-Puffer) pro Kavität einer Mikrotiterplatte. Reaktionsdauer: 8 bis 24 Stunden. Reaktionstemperatur: 4 °C.

15

Dieser Vorgang wird gefolgt von Waschschrritten (unter Verwendung des in der Folge näher definierten Waschpuffers), um die überschüssige Proteinlösung zu entfernen.

20 Schritt 2 („Blocking“):

Die gewaschenen Kavitäten werden durch Einwirkung von 5 % (w/v) Blockiermilch („nonfat dry milk“ in Aqua dest.) oder mittels 1% (w/v) BSA-Lösung (in Aqua dest.) blockiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Reaktionsdauer: 1 Stunde. Reaktionstemperatur: 30 °C. Nach der Milch/BSA-Exposition werden die Kavitäten wieder, wie unter Schritt 1, gewaschen.

25

Schritt 3 (Serumzugabe): damit beginnt die eigentliche Analysenprozedur.

100 µL Probe (=Serumverdünnung 1:20 bis 1:100 in Waschpuffer oder physiologischer NaCl-Lösung) werden in die Kavitäten pipettiert und inkubiert.

30

Die Inkubationszeiten können zwischen 4 und 24 Stunden bei 4°C bis 30°C variiert werden, ohne die diagnostische Wertigkeit zu verändern. Der Seruminkubationsschritt wird durch einen weiteren Waschvorgang, wie unter Schritt 1 und Schritt 2 beschrieben, beendet.

35 Schritt 4 („Konjugieren“):

Zugabe eines enzymmarkierten, zweiten Antikörpers, der gegen humanes IgG gerichtet ist (=Konjugat), gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C, sowie einer neuerlichen Waschprozedur. Bei dem an den zweiten Antikörper gekoppelten Enzym handelt es sich bei dem beschriebenen Ansatz um „Horseradish Peroxidase“ (HRP).

40

Schritt 5 (Substratzugabe):

Nach Beendigung der Waschvorgänge von Schritt 4 wird eine Substratlösung zugegeben, die die Grundlage für die Peroxidase-Reaktion ist und zu einer Farbentwicklung führt, welche nach Abstoppen der Reaktion mittels 0,5%iger Schwefelsäure (w/v) von

45

Schritt 6 (photometrische Messung) gefolgt wird.

50 Diese Messung ist eine spektrophotometrische Methode, die mittels eines ELISA-Readers bei Messwellenlänge von 450 nm durchgeführt wird.

Die Daten aus dieser Messung, i.e. die Extinktionen, werden als „Arbitrary Units“ (AU) zur quantitativen Beurteilung der gefundenen Immunkomplexe verwendet.

55

Interpretation:

Die Extinktionswerte werden in unauffällige und pathologische Werte eingeteilt, gemäß einer „cut-off“ Extinktion, die nach Analyse einer statistischen Anzahl von gesunden, bzw. Arthritis-negativen Probanden ermittelt wurde.

DJ Anwendungsbeispiel 2:

Quantitativer Antikörper-Nachweis mittels ELISA unter Verwendung von Proteinkombination II:

Schritt 1 („Coating“):

Einbringen von 100 µL einer mit einer Proteinkombination II- Lösung mit einer Gesamtprotein-konzentration von 0,2 - 1,5 µg/mL (in einem Coating-Puffer) pro Kavität einer Mikrotiterplatte. Reaktionsdauer: 8 bis 24 Stunden. Reaktionstemperatur: 4 °C.

Dieser Vorgang wird gefolgt von Waschschritten (unter Verwendung des in der Folge näher definierten Waschpuffers), um die überschüssige Proteinlösung zu entfernen.

Schritt 2 („Blocking“):

Die gewaschenen Kavitäten werden durch Einwirkung von 5 % (w/v) Blockiermilch („nonfat dry milk“ in Aqua dest.) oder mittels 1% (w/v) BSA-Lösung (in Aqua dest.) blockiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Reaktionsdauer: 1 Stunde. Reaktionstemperatur: 30 °C. Nach der Milch/BSA-Exposition werden die Kavitäten wieder, wie unter Schritt 1, gewaschen.

Schritt 3 (Serumzugabe): damit beginnt die eigentliche Analysenprozedur.

100 µL Probe (=Serumverdünnung 1:20 bis 1:100 in Waschpuffer oder physiologischer NaCl-Lösung) werden in die Kavitäten pipettiert und inkubiert.

Die Inkubationszeiten können zwischen 4 und 24 Stunden bei 4°C bis 30°C variiert werden, ohne die diagnostische Wertigkeit zu verändern. Der Seruminkubationsschritt wird durch einen weiteren Waschvorgang, wie unter Schritt 1 und Schritt 2 beschrieben, beendet.

Schritt 4 („Konjugieren“):

Zugabe eines enzymmarkierten, zweiten Antikörpers, der gegen humanes IgG gerichtet ist (=Konjugat), gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C, sowie einer neuerlichen Waschprozedur. Bei dem an den zweiten Antikörper gekoppelten Enzym handelt es sich bei dem beschriebenen Ansatz um „Horseradish Peroxidase“ (HRP).

Schritt 5 (Substratzugabe):

Nach Beendigung der Waschvorgänge von Schritt 4 wird eine Substratlösung zugegeben, die die Grundlage für die Peroxidase-Reaktion ist und zu einer Farbentwicklung führt, welche nach Abstoppen der Reaktion mittels 0,5%iger Schwefelsäure (w/v) von

Schritt 6 (photometrische Messung) gefolgt wird.

Diese Messung ist eine spektrophotometrische Methode, die mittels eines ELISA-Readers bei Messwellenlänge von 450 nm durchgeführt wird.

Die Daten aus dieser Messung, i.e. die Extinktionen, werden als „Arbitrary Units“ (AU) zur quantitativen Beurteilung der gefundenen Immunkomplexe verwendet.

Interpretation:

Die Extinktionswerte werden in unauffällige und pathologische Werte eingeteilt, gemäß einer „cut-off“ Extinktion, die nach Analyse einer statistischen Anzahl von gesunden, bzw. Arthritis-negativen Probanden ermittelt wurde.

Reagenzien, soweit nicht in der Beschreibung definiert und Präzisierung der Waschschritte:

Tubulin: Fa. ICN (Cat.No. 77112). Das Produkt liegt in flüssiger Form in einer Konzentration von 10 mg/mL vor (laut Proteinbestimmungsmethode nach Bradford). Die Reinsubstanz ist gelöst in 80 mM Piperazin-N,N' - bis [2-Ethansulfonsäure Natriumsalz], 1 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂), 1 mM Ethylenglykol-bis (β-Aminoethyläther) N,N,N',N'-Tetraessigsäure, 1 mM Guanosin-5'-triphosphat und 10% (w/v) Glycerin.

Desmin: Fa. ICN (Cat.No. 77104). Die Substanz liegt als lyophilisiertes Pulver vor und enthält produktionsbedingt 10 mM Natriumphosphat, das mit 6 M Harnstoff, 2 mM Dithiotreitol (DTT), 1 mM Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) und 10 mM Methylammoniumchlorid versetzt ist. Reinheit > 98% (Fremdproteine betreffend)

Vimentin: Fa. ICN (Cat.No. 77110). Die Substanz liegt als lyophilisiertes Pulver vor und enthält produktionsbedingt 10 mM Natriumphosphat, das mit 6 M Harnstoff, 2 mM Dithiotreitol (DTT), und 1 mM Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) versetzt ist. Reinheit > 98% (Fremdproteine betreffend).

Coating-Puffer: 50 mM Natriumcarbonat, pH 9,6

Waschlösung: 0,1 M PBS (phosphate-buffered saline) mit Zusatz von Tween 20 (0,02%-0,05% v/v), im Folgenden PBS-T

Waschvorgang: 300 µL PBS-T pro Kavität, 10 Minuten Einwirkdauer, absaugen, 2 Wiederholungen

Die vorstehende Methodenbeschreibung ist, abgesehen von den eingesetzten Proteinen, ein in vielen Varianten beschriebenes, kommerzielles Verfahren, das mit beliebigen anderen, aus der Literatur bekannten Reagenzien für das Coaten, Blockieren, Waschen und Konjugieren durchgeführt werden kann (sh z.B.: Harlow Ed und Lane David „Antibodies. A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory 1988). Die oben beschriebene Variante hat sich für die gegenständliche Analyse distinkter RA-Antikörper, die mit den Proteinkombinationen I und II reagieren, als optimal erwiesen, und ist deshalb hier detailliert beschrieben.

Patentansprüche:

1. Biochemisches Diagnostikum zur Erkennung von Rheumatoider Arthritis (RA), insbesondere bei Kindern (Juvenile idiopathische Arthritis-JIA) und bei Erwachsenen (chronische Polyarthritidis-cP) aus dem Blut (Serum), *dadurch gekennzeichnet*, dass es eine Kombination natürlicher oder rekombinanter Proteine, bestehend aus α/β-Tubulin und Desmin, gegebenenfalls zusätzlich mit nativem Vimentin tierischer Herkunft (Rind), das nicht citrulliert ist, enthält.

2. Diagnostikum nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass es eine Kombination in einem Mischungsverhältnis von 50 bis 80 % α/β-Tubulin und 20 bis 50 % Desmin enthält.

3. Diagnostikum nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass es eine Kombination von α/β-Tubulin und Desmin und Vimentin umfasst, in der α/β-Tubulin in einem Mischungsverhältnis zwischen 50 bis 80 %, Desmin zwischen 20 bis 40 % und Vimentin zwischen 5 bis 10 % enthalten sind.

4. Diagnostikum nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass es in Form einer gepufferten, gegebenenfalls weitere Hilfsstoffe enthaltenden Lösung in destilliertem Wasser mit einer Gesamtproteinmenge von 0,1 bis 1,5 µg/ml vorliegt.
5. Diagnostikum nach einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Proteinkombination in auf eine Festphase aufgebracht Form vorliegt.
6. Diagnostikum nach Anspruch 5, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Festphase eine Kavität einer Mikrotiterplatte (ELISA-Platte) ist.
7. Diagnostikum nach Anspruch 6, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Festphase zur Anwendung der Blot- oder Streifentechniken Membranen sind.

Keine Zeichnung