

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 283 303 A7



Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz
der DDR vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) G 01 N 33/577
G 01 N 33/564

DEUTSCHES PATENTAMT

(21) DD G 01 N / 317 876 5

(22) 13.07.88

(45) 10.10.90

(71) siehe (73)

(72) Ziegler, Manfred, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Kohnert, Klaus-Dieter, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Ziegler, Brigitte,
Dr. sc. nat.; Keilacker, Hubert, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Winkler, Manfred, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem., DD

(73) Zentralinstitut für Diabetes „Gerhardt Katsch“, Greifswalder Straße 11 a, Karlsburg, 2201, DD

(54) Immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper

(55) Autoantikörper, epitopspezifisch, antigenspezifisch; biologische Flüssigkeiten; monoklonale Antikörper;
Markierung; kompetitive Hemmung; Verdrängungsmessung

(57) Die Erfindung betrifft ein immunologisches Bestimmungsverfahren, nach dem epitop- bzw. antigenspezifische
Autoantikörper im Serum und anderen Körperflüssigkeiten auch in Gegenwart hoher Immunglobulinkonzentration
bestimmt werden können, ohne daß das Antigen jemals isoliert bzw. dessen Struktur aufgeklärt wurde.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Anwendung monoklonaler Antikörper erreicht, die in ihrer spezifischen
Antigenbindung durch Serumantikörper gleicher Spezifität kompetitiv gehemmt werden, d. h. nur bei Prävalenz des
fraglichen Antikörpers im Serum wird der monoklonale Antikörper nicht oder in geringem Maße gebunden. Um seine
Verdrängung zu messen, wird entweder der monoklonale Antikörper selbst markiert oder dieser von einem anderen
markierten Antikörper als Antigen konzentrationsabhängig gebunden und damit nachgewiesen. Anwendungsgebiet
ist die klinische Chemie.

Patentanspruch:

1. Immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper im Blutserum oder anderen Körperflüssigkeiten, **dadurch gekennzeichnet**, daß diese Autoantikörper durch eine Vorinkubation mit komplexem Antigenpräparat und anschließende oder gleichzeitige Inkubation mit einem monoklonalen Indikatorantikörper diesen monoklonalen Antikörper in seiner spezifischen Bindung an das Antigenpräparat inhibieren.
2. Immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß mit der gleichen komplexen Antigenpräparation aus einem polyklonalen Antikörperpool in getrennten Reaktionsgefäßen mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörperpopulationen mit unterschiedlicher Epitopspezifität der Nachweis erfolgt.
3. Immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als komplexe Antigenpräparate ungereinigte Organextrakte oder Zellsuspensionen, Mikroorganismen oder Gewebedünnschnitte mit unterschiedlichen Zelltypen verwendet werden.
4. Immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Vorinkubation vorzugsweise 1 Stunde und die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper vorzugsweise 3 Stunden erfolgen.
5. Immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die relevante Antikörperpopulation in der Testprobe direkt durch Verdrängung der Bildung des markierten monoklonalen Antikörpers nachgewiesen wird, wobei es keine speziesabhängige Beschränkung in der Anwendung dieses Verfahrens gibt.
6. Immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Inhibition der Bindung der spezifischen monoklonalen Antikörper durch einen markierten zweiten Antikörper, der gegen die Immunglobuline der Herkunftsspezies der monoklonalen Antikörper gerichtet ist, nachweisbar ist, wobei die Testprobe und der monoklonale Antikörper nicht gleicher Spezies sein darf.
7. Immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Autoantikörper gegen jede antigene Struktur, unabhängig von der Stoffklasse, bestimmbar sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein immunologisches Bestimmungsverfahren zum Nachweis diagnostisch bedeutsamer Autoantikörper vorwiegend in menschlichem, aber auch in tierischem Blutserum und anderen Körperflüssigkeiten.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Der Nachweis spezifischer Autoantikörper kann bisher nur durch Verwendung der isolierten reinen Antigene vorgenommen werden. Entweder wird das Antigen selbst mit einer Indikatorsubstanz, z. B. mit einem Enzym oder radioaktiven Isotop markiert und dessen Bindung durch Antikörper nach Abtrennung vom freien Antigen direkt gemessen (H. Keilacker, I. Rjasanowski, M. Ziegler, D. Michaelis, K.-P. Woltanski, W. Besch: Insulin antibodies in juvenile diabetes mellitus correlations to diabetic stability, insulin requirement and duration of insulin treatment. Horm. Meta. Res. 14 [1984], 227) oder das Antigen wird an einer Festphase (z. B. Sepharose oder Plaste) immobilisiert. Nach erfolgter Inkubation mit der Probe, meistens Serum, werden dann die über das Antigen an der Festphase spezifisch gebundenen Antikörper als Antigen mittels eines markierten zweiten Antikörpers nachgewiesen (M. Koch, C. François-Gérard, F. Sodoyez-Goffaux, J.-C. Sodoyez: Semi-quantitative assessment of anti-insulin total IgG and IgG subclasses in insulin-immunized patients using a highly sensitive immunochemical micromethod. Diabetologia 29 [1986], 720). Hierbei ist die Verhinderung der unspezifischen Immunglobulinbindung oft sehr problematisch, wodurch die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des Antikörpernachweises herabgesetzt wird. Dies trifft auch für den Nachweis von Antikörpern gegen zell- bzw. gewebsgebundene Antigene wie an Mikroorganismen, an isolierten Zellen (M. Ziegler, B. Ziegler, P. Heinke, I. Rjasanowski: Titre determination of autoantibodies [IGSA] against beta cell surface antigens. Fresenius Z. Analyt. Chem. 330 [1988], 354) oder an Gewebeschnitten zu (H. Gleichmann, G. F. Bottazzo: Progress toward standardization of cytoplasmic islet cell antibody assay. Diabetes 36 [1987], 578).

Nach den bisherigen Nachweisverfahren ist die Antigenspezifität des Autoantikörpernachweises nur mit Hilfe des reinen Antigens möglich, vorausgesetzt, das Antigen läßt sich markieren oder an eine Festphase immobilisieren, ohne seine Immunreaktivität einzubüßen.

Steht als Target nur ein komplexer Antigenpool zur Verfügung, z. B. ein Organextrakt oder Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Zelltypen, so werden alle bindenden Antikörper erfaßt, unabhängig von ihrer diagnostischen Relevanz. Zusätzlich werden die unspezifisch gebundenen Immunglobuline mitbestimmt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist ein zuverlässiges Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung spezifischer, diagnostisch relevanter Autoantikörper mit geringem technischen Aufwand.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein immunologisches Nachweisverfahren für spezifische Autoantikörper im Serum und anderen Körperflüssigkeiten bei gleichzeitiger Umgehung der unspezifischen Bindung der Immunglobuline der Testprobe anzugeben, wobei die Struktur und Stoffklasse der Antigene, mit denen die monoklonalen Antikörper reagieren, noch unbekannt sein können.

Die aufgezeigten Nachteile des gegenwärtigen Standes der Verfahrenstechnik zur spezifischen Autoantikörperbestimmung werden erfindungsgemäß in vorteilhafter Weise durch Anwendung monoklonaler Antikörper behoben, die z. B. nach der diagnostischen Relevanz hinsichtlich ihrer Antigenspezifität aufgrund der kompetitiven Inhibition ihrer Antigenbindung durch polyklonale Antikörper von Patientenserum mit bestimmten Krankheitsbildern ausgewählt wurden.

Dieses Verfahren besteht darin, daß monoklonale Antikörper mit der für die Autoantikörperbestimmung relevanten Spezifität durch das an eine Festphase immobilisierte komplexe Antigengemisch nur epitopspezifisch gebunden werden und durch Vorinkubation, vorzugsweise im Zeitraum von 1 Stunde oder gleichzeitiger Inkubation bis vorzugsweise 3 Stunden, beispielsweise mit menschlichen Seren oder anderem Probenmaterial, in ihrer Bindung reduziert oder komplett inhibiert werden, abhängig von der Prävalenz und Konzentration der polyklonalen Antikörper mit identischer Epitopspezifität in der Testprobe.

Die Bindung bzw. spezifische Verdrängung des monoklonalen Antikörpers ist direkt meßbar, wenn dieser in markierter Form eingesetzt wird. Andernfalls wird der antigengebundene spezifische monoklonale Antikörper durch einen, diesen monoklonalen Antikörper bindenden, markierten zweiten Antikörper bestimmt, wobei die an irrelevanten Antigenen gebundenen humanen Antikörper und die unspezifisch gebundenen Serumimmunglobuline nicht miterfaßt werden. Dadurch wird eine höhere Spezifität und gleichzeitig höhere Empfindlichkeit des Autoantikörpernachweises erreicht.

Als Targetantigenpräparate können z. B. Organ- oder Zellextrakte, Mikroorganismen, Zellsuspensionen und Gewebedünnschnitte verwendet werden.

Die Spezifität der nachgewiesenen Autoantikörper hängt von der Spezifität des monoklonalen Antikörpers ab. Das Verfahren ist auch geeignet, um für immobilisierte reine Antigene epitopspezifische Autoantikörper nachzuweisen.

Ausführungsbeispiel

Das erfindungsgemäße Verfahren soll nachstehend näher erläutert werden. Erfindungsgemäß sollen spezifische Autoantikörper beispielsweise gegen Betazellen beim insulinabhängigen (Typ 1) Diabetes mellitus und gegen Schilddrüsenantigene bei Basedow-Patienten nachgewiesen werden.

1. Beispiel

In jede Vertiefung einer 96-Mikrotesplatte werden 50 000 Zellen als Targetantigenpräparat einer insulinproduzierenden Ratteninsulinom-Zelllinie pipettiert und eingetrocknet. In 20 Vertiefungen werden jeweils 50 µl Kontrollserum gesunder Spender und in die übrigen 50 µl Serum von frisch-manifestierten Typ-1-Diabetikern jeweils als Dreifachbestimmung pipettiert. Nach 1 h Vorinkubation bei Raumtemperatur werden von einem murinen monoklonalen Betazell-Antikörper 50 µl in jedes Reaktionsgefäß hinzupipettiert. Nach gründlichem Vermischen wird nochmals 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die komplette Platte wird entleert und zweimal gewaschen. Zum Nachweis des gebundenen monoklonalen Betazell-Antikörpers werden 100 µl eines mit Peroxidase markierten Antikörpers gegen Mausimmunglobulin hinzugegeben. Nach 90 min Inkubation wird die Platte entleert, gewaschen und zur Farbentwicklung 30 min bei Raumtemperatur mit 100 µl o-Phenyldiamin/H₂O₂ inkubiert und mit 100 µl 1 mol/l H₂SO₄ gestoppt. Die Farbextinktion wird bei 492 nm im SUMA-System gemessen. Serumproben, die eine Verminderung der Extinktion auf weniger als $\bar{x} - 3D$ der Kontrollseren verursachen, werden als Autoantikörper-positiv gewertet.

2. Beispiel

Eine Inselzellsuspension mit 5×10^4 Zellen in 50 µl Zellkulturmedium werden 1 h mit 50 µm Serum von Kontrollpersonen bzw. frischmanifestierten Typ-1-Diabetikern in einem Proberöhrchen inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl eines monoklonalen Betazell-Oberflächen-Antikörpers und weiterer Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur werden die Zellen zweimal gewaschen und mit Fluoresceinisothiocyanat markierten Autoantikörpern gegen Mausimmunglobulin inkubiert und gewaschen. Die Zellen werden auf Objektträger übertragen und der prozentuale Anteil der Oberflächenfluoreszenz-positiven Zellen werden am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Serumproben, die eine Verminderung auf weniger als $\bar{x} - 3SD$ fluoreszierenden Zellanteil der Kontrollseren verursachen, werden als Autoantikörper-positiv gewertet.

3. Beispiel

Glasröhrchen werden am Boden mit Ratteninsulinomzellen überzogen und 50 µl eines murinen monoklonalen Betazellen-Antikörpers in Zellkulturmedium und 50 µl Serum von Kontrollpersonen bzw. frischmanifestierten Typ-1-Diabetikern werden über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Abgießen der Überstände und Waschen der Zellen werden diese nochmals 30 min mit 100 µl ¹²⁵J-Anti-Mausimmunglobulin bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Waschen wird die gebundene Radioaktivität im Gamma-Counter gemessen. Serumproben, die eine Verminderung der Radioaktivität auf weniger als $\bar{x} - 3SD$ der Kontrollserumproben verursachen, werden als Autoantikörper-positiv gewertet.

4. Beispiel

Mikrotiterplatten werden mit Schilddrüsenmembranen als Targetantigenpräparat beschichtet. In 20 Vertiefungen werden jeweils 50 µl Kontrollserum gesunder Blutspender und in die übrigen 50 µl Serum von Patienten mit immunogener Schilddrüsenerkrankung jeweils als Dreifachbestimmung pipettiert. Nach 1 h Vorinkubation bei Raumtemperatur werden 50 µl

eines murinen monoklonalen Schilddrüsenantikörpers in jedes Reaktionsgefäß hinzupipettiert. Nach gründlichem Vermischen wird nochmals 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die komplette Platte wird entleert und gewaschen. Zum quantitativen Nachweis der Bindung bzw. der Verdrängung der monoklonalen Antikörper werden diese, wenn sie selbst nicht markiert sind, durch die indirekte Methode mit einem POD-markierten Antikörper gegen Mausimmunglobulin mit der üblichen Farbentwicklung (siehe Beispiel 1) sichtbar gemacht.

Serumproben, die eine Verminderung der Extinktion auf weniger als $\bar{x} - 3SD$ der Kontrollseren verursachen, werden als Autoantikörper-positiv gewertet.