



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1. Patentgesetz

(19) **DD** (11) **259 045 A1**

4(51) G 01 N 33/68

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 301 366 6

(22) 01.04.87

(44) 10.08.88

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6, Berlin, 1086, DD

(72) Bürger, Wolf, Dr. rer. nat Dipl.-Chem.; von Baehr, Rüdiger, Prof. Dr. sc. med.; Porstmann, Thomas, Doz. Dr. sc. med., DD

(54) **Verfahren zur quantitativen Bestimmung von C-reaktivem Protein (CRP)**

(55) Konzentrationsbestimmung, C-reaktives Protein, klinische Laboratoriumsdiagnostik, Ligandimmunoassay, Serumproteine, klinische Anwendung, Ligand-Träger-Konjugat, Festphaseassay, Zweiseitenbindungsassay

(57) Objekt der Erfindung ist die quantitative Bestimmung eines Serumproteins, genannt C-reaktives Protein. Ihr Anwendungsgebiet ist die klinische Laboratoriumsdiagnostik, da die Konzentration des CRP im Serum und anderen Körperflüssigkeiten Rückschlüsse zuläßt auf den gesundheitlichen Zustand der untersuchten Patienten bzw. auf den gesundheitlichen Zustand von Tieren. Die Konzentrationsbestimmung wird durchgeführt als Ligandimmunoassay, d. h., es kommen Ligand-Träger-Konjugate sowie markierte α -CRP-Konjugate zum Einsatz. Durch das hier beschriebene Verfahren ergibt sich eine erhebliche Testzeitverkürzung und Einsparung von spezifischen bzw. monoklonalen Antikörpern, deren Herstellung und Reinigung aufwendig ist, von etwa 90%, wodurch das Verfahren kostengünstig ist. Vorteile ergeben sich weiterhin bei bestimmten Problempunkten mit hohem Rheumafaktorgehalt. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß zur Bindung des CRP für die Benetzung der festen Phase in einem Zweiseitenbindungsassay einfach herstellbare Ligand-Träger-Konjugate benutzt werden, während der Nachweissschritt weiterhin mittels markierter Antikörper erfolgt.

Patentanspruch:

Verfahren zur quantitativen Bestimmung von C-reaktivem Protein (CRP), **dadurch gekennzeichnet**, daß das CRP in einem Festphase-Zweiseitenbindungsassay zunächst mit Ligand-Träger-Konjugaten bei 0 bis 45°C, vorzugsweise 20°C, innerhalb von 5 bis 20 min reagiert und anschließend mit spezifischen bzw. monoklonalen markierten α -CRP-Antikörpern umgesetzt wird.

Verfahren nach Anspruch 1 ist **gekennzeichnet dadurch**, daß als Ligand-Trägerkonjugate Galaktane, Polykationen und Polyanionen, Histone, Protamine, Nucleinsäuren, Aminoalkyl- bzw. mono-, di-, tri-Alkylaminoalkylphosphorylverbindungen, vorzugsweise β -Aminoalkylphosphoryl-Konjugate eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung stellt ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung von C-reaktivem Protein dar. Die Konzentration des CRP im Serum und anderen Körperflüssigkeiten erhöht sich bei bakteriellen Infektionen, Verletzungen, nach chirurgischen Eingriffen, Verbrennungen, Gewebsuntergängen.

Durch die Bestimmung der Konzentration des CRP erhält der Kliniker Hinweise auf den Zustand des Patienten, da bei Gesunden Normalwerte erreicht werden. Hauptsächlich Anwendungen sind z. B. Erkennen und Beurteilen von Heilungsverläufen nach chirurgischen Eingriffen und Verletzungen, Sepsis bei Neugeborenen, Nachweis von Infarkten und Nekrosen, Zustand bei chronischen Entzündungen, Verläufe und Differentialdiagnose bei akuten bakteriellen und viralen Infektionen.

Anwendungsgebiet ist daher die klinische Laboratoriumsdiagnostik. Da Wirbeltiere in ähnlicher Weise reagieren, ist das Verfahren auch für die Überwachung von Tierbeständen und die Beurteilung des Zustandes von Tieren geeignet.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die quantitative Bestimmung von Eiweißen in Körperflüssigkeiten findet Anwendung in der klinischen Laboratoriumsdiagnostik. Empfindliche Methoden sind bei der Analytik von Hormonen und einer Reihe von Plasmaproteinen notwendig. In den letzten Jahren haben sich hierfür Immunoassays durchgesetzt, die Antikörper einsetzen: Radioimmunoassays, Enzymimmunoassays, Fluorimmunoassays, jetzt auch Lumineszenzimmunoassays. Bei diesen Immunoassays gibt es verschiedene Konstruktionen. Homogene und heterogene Assays, kompetitive Tests, direkte und indirekte Zweiseitenbindungsassays, Immunglobulin- und Antigenbindungsassays, Capture-technik. Bei allen diesen Verfahren findet im entscheidenden Schritt eine Reaktion zwischen spezifischen Antikörpern und Antigen bzw. Hapten statt. Die quantitative Auswertung der Reaktion wird durch Zählung radioaktiver Zerfallsprozesse, Substratreaktionen mit anschließender optischer Auswertung, Fluoreszenzuntersuchungen oder Messung der Chemilumineszenz erreicht. Die Empfindlichkeit der Methoden ist hoch, die Meßbereiche liegen in Konzentrationsbereichen von $\mu\text{g/l}$ bzw. ng/l im Test. Hauptnachteil dieser Tests ist die relativ lange Versuchszeit von mehreren Stunden bzw. Tagen. Antikörpertests führen weiterhin bei niedrigem Titer und hoher Rheumafaktorkonzentration zu falsch erhöhten Werten. Am Beispiel des CRP in Gegenwart von Rheumafaktoren wurde dies beschrieben von J. Highton und P. Hessian, J. Immunol. Meth. **68** (1984) 185–192. Immunoassays sind relativ teuer, da die Herstellung, Aufarbeitung und Spezifitätsuntersuchung von polyklonalen bzw. monoklonalen Antikörpern aufwendig ist, d. h., Verringerung des mengenmäßigen Einsatzes an diesen Materialien ist wünschenswert.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein schnelleres und kostengünstiges Verfahren zur quantitativen Bestimmung des CRP zu entwickeln, wobei gleichzeitig eine richtige Konzentrationsbestimmung bei Problemproben (bei hoher Konzentration von Rheumafaktoren) möglich ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des CRP zu entwickeln, indem die Nachteile der bisherigen Verfahren vermieden werden durch die Anwendung neuer Bindungspartner. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, indem ein Festphasen-Zweiseitenbindungsassay entwickelt wurde, wo das CRP mit festphasengebundenen Liganden folgender chemischer Strukturen: Galaktane (galaktosehaltige Polysaccharide), Polykationen und Polyanionen, Bindung an Histone, Protamine, Nucleinsäuren, Aminoalkyl- bzw. mono-, di-, tri-Alkylaminoalkylphosphorylverbindungen, Cu-haltige Proteine und β -Aminoalkyl-phosphoryl-konjugaten reagiert und in einem zweiten Reaktionsschritt mit markierten CRP-Antikörpern umgesetzt wird. Als besonders vorteilhaft hat sich der Einsatz von β -Aminoalkylphosphoryl-Trägerprotein-Konjugaten zur Bestimmung von C-reaktivem Protein erwiesen. Das Verfahren ist weiterhin gekennzeichnet durch einen Temperaturbereich von 0 bis 45°C, vorzugsweise 20°C, und einer Reaktionszeit von 30 bis 320 min. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,1 mg/l CRP bei einem Normbereich bis 8 mg/l bei gesunden Erwachsenen. Der Meßbereich des Tests liegt zwischen 1 und 50 $\mu\text{g/l}$. In diesem Bereich betragen die Variationskoeffizienten unter 10% in der Serie und 6–12% von Tag zu Tag bei dem im Anwendungsbeispiel beschriebenen Beispiel. Die Ligand-Träger-Konjugate können mit Hilfe von Kopplungsreaktanten bzw. durch unspezifische Bindung hergestellt werden, als praktikabel hat sich die Kopplung von Trägerprotein (z. B. Albumin, -Globulin, Ferritin) an β -Aminoalkylphosphat mittels Glutardialdehyd und anschließender

Reduktion mit Natriumborhydrid erwiesen, die spezifischen Antikörper gegen CRP gewinnt man durch Immunisierung von geeigneten Tieren (z. B. Schafen, Kaninchen) und anschließender Festsphaseabsorption bzw. Affinitätschromatographie der gewonnenen Antiseren.

Ausführungsbeispiel

Zweiseitenbindungsassay zur Bestimmung von C-reaktivem Protein

Aus β -Aminoethylphosphat und Trägerprotein wird unter Verwendung von Glutaraldehyd ein Ligand-Protein-Konjugat hergestellt und mittels 0,1 m Karbonatlösung, pH = 9,5 auf eine Konzentration von 3,2 mg/l verdünnt. Diese Lösung wird zur Festphaseadsorption in geeignete Trägermaterialien überführt. Die Inkubation wird über Nacht bei 4°C ausgeführt. Anschließend wird die Flüssigkeit entfernt und die Träger bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert. Für den Test werden die benetzten Festphasenträger auf Raumtemperatur erwärmt und mit Calziumpuffer (0,02 m) pH = 7,3 mindestens zweimal gewaschen, mit der jeweiligen Standard- und Probeverdünnung in Calziumpuffer (1:1000 und 1:5000) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Lösung und zweimaligem Waschen mit Calziumpuffer wird mit Peroxydase-a-CRp-antikörperlösung (0,5 mg/l) 30 min bei 37°C ebenfalls in Calziumpuffer belassen. Nach Entfernen der Lösung und dreimaligem Waschen wird die Substratreaktion mit o-Phenylendiamin/H₂O₂ durchgeführt und nach 5 min mit Schwefelsäure (1 m/l) gestoppt, die Extinktion am Mehrkanalphotometer resp. Spektrophotometer gemessen, die Eichkurve gekennzeichnet und die Konzentration der Proben ermittelt.