



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 259 046 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 / 301 367 4	(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., DD

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

(55) Konzentrationsbestimmung, C-reaktives Protein, klinische Laboratoriumsdiagnostik, Ligandassay, Serumproteine, klinische Anwendung, Ligand-Träger-Konjugat, kompetitiver Assay, Festphaseassay

(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 Ligandassay, d. h., ohne die Anwendung von spezifischen Antikörpern, wie sonst in derartigen Testen üblich (Immunoassays). Durch das hier beschriebene Verfahren werden mehrere Nachteile beseitigt, die die bislang durchgeführten Tests besitzen. Es entfällt die aufwendige und den Einsatz von Tiermaterial benötigende Erzeugung von spezifischen Antisera/Antikörpern. Es ergeben sich merkliche Vereinfachungen bei der Testausführung, insbesondere was die Verdünnung der Proben anbetrifft, der Test ist bedeutend schneller als die Antikörperassays und schließlich ist das Verfahren kostengünstig, da die Reaktanten relativ einfach hergestellt werden können. Das Verfahren ist dadurch charakterisiert, daß markiertes CRP, das in konstanter Menge zugegeben wird, mit dem Proben-CRP um die Bindungsstellen an einem Ligand-Trägerkonjugat konkurriert. Nach Inkubation und Abtrennung der ungebundenen Moleküle ergibt sich mit Hilfe einer Standardkurve die gesuchte Konzentration in der Probe.



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 259 046 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 / 301 367 4

(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., DD

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

(55) Konzentrationsbestimmung, C-reaktives Protein, klinische Laboratoriumsdiagnostik, Ligandassay, Serumproteine, klinische Anwendung, Ligand-Träger-Konjugat, kompetitiver Assay, Festphaseassay

(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 Ligandassay, d. h., ohne die Anwendung von spezifischen Antikörpern, wie sonst in derartigen Testen üblich (Immunoassays). Durch das hier beschriebene Verfahren werden mehrere Nachteile beseitigt, die die bislang durchgeführten Tests besitzen. Es entfällt die aufwendige und den Einsatz von Tiermaterial benötigende Erzeugung von spezifischen Antisera/Antikörpern. Es ergeben sich merkliche Vereinfachungen bei der Testausführung, insbesondere was die Verdünnung der Proben anbetrifft, der Test ist bedeutend schneller als die Antikörperassays und schließlich ist das Verfahren kostengünstig, da die Reaktanten relativ einfach hergestellt werden können. Das Verfahren ist dadurch charakterisiert, daß markiertes CRP, das in konstanter Menge zugegeben wird, mit dem Proben-CRP um die Bindungsstellen an einem Ligand-Trägerkonjugat konkurriert. Nach Inkubation und Abtrennung der ungebundenen Moleküle ergibt sich mit Hilfe einer Standardkurve die gesuchte Konzentration in der Probe.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Zur PS Nr. 259.046

ist eine Zeitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges. z. Pat.Ges.)

Patentanspruch:

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von C-reaktivem Protein (CRP), **dadurch gekennzeichnet**, daß das CRP mit Ligand-Trägerkonjugate bei 0 bis 45°C, vorzugsweise 20°C, innerhalb von 5 bis 120 min reagiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **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 eines Patienten, da bei Gesunden Normalwerte erreicht werden. Hauptsächlich Anwendungen sind z. Z. 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-techniken. 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. Diese Tests bieten in der praktischen Durchführung einige Schwierigkeiten: Die hohe Empfindlichkeit erfordert in der Regel, daß sehr verdünnte Lösungen der Proben eingesetzt werden, die exakt angefertigt werden müssen, was zu großem Aufwand bei hohen Probenzahlen führt. Weiterhin sind bei den üblichen Assays die Versuchszeiten relativ lang, d. h., die Tests dauern mehrere Stunden bzw. Tage. Antikörpertests führen 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 Antisera bzw. Antikörpern aufwendig ist. Es ist der Einsatz von Tiermaterial notwendig. Das gleiche trifft zu bei der Anwendung von monoklonalen Antikörpern.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Verfahren zur quantitativen Bestimmung des CRP zu entwickeln, wobei gleichzeitig eine richtige Konzentrationsbestimmung bei Problemseren (hohe Konzentration an 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 unter Vermeidung von Antikörpern bzw. Antisera. Das Verfahren hat weiterhin die Aufgabe, praktikabel zu sein und die Untersuchung großer Probenmengen mit vertretbarem Aufwand zuzulassen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, indem das CRP mit Liganden folgender chemischer Strukturen: Galaktane (galaktosehaltige Polysaccharide), Polykationen und Polyanionen, Bindung an Histone, Protamine, Nucleinsäuren, Aminoalkyl- bzw. mono-, di-, tri-Alkylaminoalkylphosphorylverbindungen, Cu-haltige Proteine. 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 5 bis 120 min, vorzugsweise 15 min. Die untere Nachweisgrenze beträgt 1 mg/l CRP bei einem Normbereich bis 8 mg/l bei gesunden Erwachsenen. Der Meßbereich des Tests liegt zwischen 0,03 und 0,50 mg/l. In diesem Bereich betragen die Variationskoeffizienten unter 15% in der Serie und rund 13–18% 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 Glutaraldehyd und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid erwiesen.

Ausführungsbeispiel

Kompetitiver Ligandassay zur Bestimmung von C-reaktivem Protein unter Verwendung von Ligand-Protein-Konjugat
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. Es werden Standard- und Probenverdünnungen in Calziumpuffer (0,02 M) pH = 7,3, im Verhältnis 1:50 angefertigt. Auf einer nichtbenetzten Mikortiterplatte werden gleiche Mengen dieser Proben und einer Lösung von 0,32 mg/l Peroxidase-C-reaktives-Protein-Konjugat in Calziumpuffer gemischt. Stehen die Mischungen zur Verfügung, so werden sie in einheitlicher Menge innerhalb einer Minute in die entsprechenden benetzten und gewaschenen Trägermaterialien überführt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 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 auf halblogarithmischem Papier gezeichnet und die Konzentration der Proben ermittelt.