

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. September 2001 (07.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/65270 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01R 33/60**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/02248**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
28. Februar 2001 (28.02.2001)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
100 11 163.7 28. Februar 2000 (28.02.2000) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **E.W. HANDELS- UND CONSULTING GMBH** [DE/DE]; Lindenstrasse 4, 15732 Eichwalde (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MURAVSKY, Vladimir, A.** [BY/BY]; Nekrasovstr., 29-58, 220040 Minsk (BY). **MILUTIN, Alexander** [BY/BY]; Slobodskaya Str., 117-5, 220075 Minsk (BY). **MATTHES, Gert, A.** [DE/DE]; An der Kolonnade 15, 10117 Berlin (DE). **SEIBT, Günter** [DE/DE]; Lindenstrasse 4, 15732 Eichwalde (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE ESR-SPECTROSCOPIC DETECTION OF CHANGES IN THE TRANSPORT PROPERTIES OF ALBUMIN IN AN ALBUMIN-CONTAINING SAMPLE, ESR-SPECTROMETER FOR CARRYING OUT SAID METHOD, AND USE OF THE METHOD FOR DIAGNOSTIC PURPOSES AND FOR CONTROLLING ALBUMIN-CONTAINING PREPARATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ESR-SPEKTROSKOPISCHEN BESTIMMUNG VON VERÄNDERUNGEN DER TRANSPORTEIGENSCHAFTEN DES ALBUMINS IN EINER ALBUMINHALTIGEN PROBE, ESR-SPEKTROMETER ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS UND EINSATZ DES VERFAHRENS ZUR DIAGNOSE UND ZUR KONTROLLE ALBUMINHALTIGER PRÄPARATE

(57) Abstract: The invention relates to method for the ESR-spectroscopic detection of changes in the transport properties of albumin in an albumin-containing sample. Said method can be used in the medical, biological, biotechnological and veterinary praxis for diagnostic purposes and/or for monitoring physiological or pathological changes in the human or animal body or for the quality control of albumin-containing preparations, especially blood products. The invention further relates to an ESR spectrometer for carrying out the inventive method, which - being an automated ESR analyzer - allows for a simple and reliable handling required in modern clinical laboratories. The inventive ESR spectrometer integrates automatic device controls, signal registration and signal evaluation in combination with a computer program for the diagnostic analysis of the measured data.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein in der medizinischen, biologischen, biotechnologischen und veterinärmedizinischen Praxis anwendbares Verfahren zur ESR-spektroskopischen Bestimmung von Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins in einer albuminhaltigen Probe, das zur Diagnose und/oder Überwachung physiologischer oder pathologischer Veränderungen im menschlichen oder tierischen Körper oder zur Qualitätskontrolle von albuminhaltigen Präparaten, insbesondere Blutprodukten, eingesetzt werden kann. Gegenstand der Erfindung ist auch ein ESR-Spektrometer zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, das als automatisierter ESR-Analysator den Anforderungen einfacher und zuverlässiger Handhabung in der modernen klinischen Laborpraxis gerecht wird, indem es automatische Gerätesteuern, Signalregistrierung und Signalauswertung im Zusammenwirken mit einem Computerprogramm zur diagnostischen Analyse der Meßdaten integriert.

WO 01/65270 A2

5

**Verfahren zur ESR-spektroskopischen Bestimmung von
Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins
in einer albuminhaltigen Probe, ESR-Spektrometer zur
Durchführung des Verfahrens und Einsatz des
Verfahrens zur Diagnose und zur Kontrolle
albuminhaltiger Präparate**

15

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein in der medizinischen,
biologischen, biotechnologischen und
veterinärmedizinischen Praxis anwendbares Verfahren zur
ElektronenSpinResonanz (ESR)-spektroskopischen Bestimmung
von Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins
in einer albuminhaltigen Probe, das zur Diagnose und/oder
Überwachung physiologischer oder pathologischer
Veränderungen im menschlichen oder tierischen Körper oder
zur Qualitätskontrolle von albuminhaltigen Präparaten,
insbesondere Blutprodukten, eingesetzt werden kann.
Gegenstand der Erfindung ist auch ein ESR-Spektrometer zur
Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Es ist bekannt, zur Diagnose von Krankheiten hämato-
logische Parameter oder Parameter betreffend Antigene,
Hormone, Enzyme und andere biologisch aktive Substanzen
heranzuziehen, was in der klinisch-chemischen Routine-
diagnostik breite Anwendung findet.

Auch die NMR- und die ESR-Spektroskopie können in der
Krankheitsdiagnostik zur Erfassung struktureller und
funktioneller Eigenschaften von Protein- und
Lipidkomponenten im Blutserum eingesetzt werden. Obwohl

5 die Anwendung der ESR-Spektroskopie unter Einsatz von
Spinlabels zur Untersuchung von Bewegungsvorgängen in
Makromolekülen bekannten Stand der Technik darstellt,
scheiterte die breite Einführung dieser Testmethode in die
klinische Routinediagnostik bisher an den hohen
10 Ausrüstungskosten und an der komplizierten oder nicht
zuverlässigen Analyse der Signale.

SU 1319705 A1 beschreibt ein Verfahren zur Diagnose von
bösartigen Erkrankungen, indem mittels ESR die Fähigkeit
15 des Blutplasmas oder Blutserums gemessen wird, eine
eingebrachte Spinsonde zu binden. Es wird der
Bindungskoeffizient α , der das Verhältnis der Amplitude
des Peaks A zur Amplitude des Peaks B darstellt, bestimmt.
Ist $\alpha > 1$, so handelt es sich um eine cancerogene
20 Erkrankung. Bei $\alpha < 1$ ist der Proband gesund.

Das beschriebene Verfahren hat den Nachteil, daß es nicht
sensitiv genug arbeitet und deshalb keine zuverlässige
Diagnose liefern kann. Untersuchungen zu dieser Methode
25 haben gezeigt, daß die falsch-positiven und falsch-
negativen Diagnoseaussagen im frühen Krankheitsstadium $\geq$
30% betragen.

EP 0 973 043 A1 beschreibt ein ESR-spektroskopisches
30 Verfahren zur Diagnose von malignen Neoplasmen im
Blutserum, bei dem physiko-chemische Parameter der
Spinsondenmobilität einer Spinsonde, die eine
spinmarkierte Fettsäure darstellt, in den drei
Bindungsstellen des Albumins bestimmt werden.

35 Albumin ist die Hauptkomponente im Transportsystem des
Blutes, die den Transport von Fettsäuren, Tryptophan,
Bilirubin, Kalzium, Steroidhormonen und anderen
funktionell wichtigen Wirkstoffen an die Zielzelle
ermöglicht und dabei an der Bindung und Verteilung einer
40 Vielzahl von Toxinen (darunter auch endogenen Ursprungs)

- 5 beteiligt ist. Albumin ist ein Polypeptid
(Molekulargewicht 68.000) mit einer großen
Bindungskapazität für exogene (Arzneimittel) und endogene
Substanzen. Es besteht aus 585 Aminosäuren, die durch
Disulfidbrücken in einer Schleifenstruktur angeordnet
10 sind. In der Literatur werden verschiedene Bindungsstellen
am Serumalbumin unterschieden. Für Fettsäuren existieren
die sogenannten Bindungsstellen 1, 2 und 3 im
Albuminmolekül.
- 15 Beim Diagnoseverfahren gemäß EP 0 973 043 A1 wird die
Krebserkrankung durch die Abweichung der Parameter der
Spinsondenbindung von den Werten bestimmt, die gesunde
Probanden aufweisen.
- 20 Mit dem ESR-Verfahren gemäß EP 0 973 043 A1 wird also der
konkrete native Konformationszustand des Albumins im Blut
bestimmt, der bei Vorliegen eines cancerogenen Befundes
verändert gegenüber dem eines gesunden Probanden ist. Es
hat sich gezeigt, daß dieses Verfahren falsch-positive
25 oder falsch-negative Aussagen liefert, wenn zusätzliche
Einflüsse aus dem Blut auf das Albumin vorhanden sind,
z.B. erhöhte Blutfettwerte, Medikamenteneinnahme oder
Einflüsse vom Lösungsmittel der Spinsonde oder durch
Aufbewahrung der Blutprobe an der Luft.
- 30 Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein
kostengünstiges und schnell durchführbares Verfahren zur
ESR-spektroskopischen Bestimmung von albuminhaltigen
Proben, insbesondere Blutproben, bereitzustellen, das
35 richtige und reproduzierbare Aussagen zur Konformation des
Albumins unter Berücksichtigung der genannten Einflüsse
erlaubt und in der klinisch-chemischen Laborpraxis
anwendbar ist. Das Verfahren soll zur frühzeitigen
Diagnose und/oder Überwachung physiologischer oder
40 pathologischer Veränderungen im menschlichen oder
tierischen Körper, zur Qualitätskontrolle albuminhaltiger

5 Materialien, insbesondere von Blutkonserven, und zur Beurteilung der Detoxifikationskapazität von Albuminmolekülen geeignet sein. Aufgabe der Erfindung war es auch, ein Gerät zur vorteilhaften Durchführung des Verfahrens bereitzustellen.

10

Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst, indem die Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins in der zu untersuchenden Probe mittels ESR-Spektroskopie bestimmt werden, indem in der zu untersuchenden Probe
15 gezielte Konformationsänderungen des Albuminmoleküls mittels eines polaren Reagenzes unter Zusatz einer geeigneten Spinsonde induziert werden. Es hat sich gezeigt, daß die mittels ESR bestimmbaren Parameter der Bindung einer Spinsonde an spezifische, bekannte
20 Bindungsstellen des Albumins mit biophysikalischen Parametern der Albuminkonformation korrelieren und letztere zuverlässige Aussagen über physiologische oder pathologische Veränderungen im menschlichen oder tierischen Körper oder auch in Präparaten der
25 Transfusions- oder Transplantationsmedizin erlauben.

Erfindungsgemäß werden aliquoten Teilen der Probe mindestens drei, vorzugsweise bis zu acht, unterschiedliche Konzentrationen einer mit dem Albumin
30 bindenden Spinsonde und zusätzlich mindestens drei, vorzugsweise bis zu acht, unterschiedliche Konzentrationen eines polaren Reagenzes zugesetzt, anhand der ESR-Spektren der mit Spinsonde und polarem Reagenz versetzten aliquoten Teile der Grad der Veränderung der Bindungsparameter der
35 Spinsonde an spezifische Bindungsstellen des Albumins in Abhängigkeit von der Spinsondenkonzentration und der Konzentration an polarem Reagenz mittels Computersimulation der ESR-Spektren bestimmt und die Veränderung der Transporteigenschaften des Albumins aus
40 den Veränderungen der Werte der Bindungsparameter der Spinsonde für die durch die unterschiedlichen

5 Konzentrationen an Spinsonde und polarem Reagenz
induzierten Konformationszustände des Albumins berechnet,
wobei die zuzusetzenden Konzentrationen an Spinsonde so
ausgewählt werden, daß der Mittelwert des Verhältnisses
der Konzentration der Spinsonde zur Konzentration des
10 Albumins $2,5 \pm 0,5$ beträgt und ausgehend von diesem
Mittelwert mindestens zwei zusätzliche Konzentrationen
ausgewählt werden, deren Abweichung von diesem Mittelwert
nicht geringer als 1,0 ist. Die zuzusetzenden
Konzentrationen an polarem Reagenz werden so ausgewählt,
15 daß der Mittelwert der Endkonzentration des polaren
Reagenzes in den Aliquoten $(0,6 \pm 0,25) \cdot C_p$ beträgt, wobei C_p
die kritische Konzentration des polaren Reagenzes
darstellt, dessen Überschreitung zur Denaturierung des
Albumins führt, und ausgehend von diesem Mittelwert
20 mindestens zwei zusätzliche Konzentrationen an polarem
Reagenz ausgewählt werden, deren Abweichung von diesem
Mittelwert mindestens 15% beträgt.

Dabei müssen die Konzentrationen an Spinsonde und polarem
25 Reagenz, die den jeweiligen aliquoten Teilen der Probe
zugesetzt werden, innerhalb der angegebenen
Konzentrationsbereiche so gewählt werden, daß mindestens
in einem aliquoten Teil eine geringe Sondenkonzentration
und eine geringe Konzentration an polarem Reagenz, in
30 mindestens einem aliquoten Teil eine hohe
Sondenkonzentration und eine hohe Konzentration an polarem
Reagenz und in mindestens einem aliquoten Teil eine
mittlere Konzentration an polarem Reagenz und eine
mittlere Konzentration Sonde vorhanden sind (3-Spektren-
35 Screening-Analyse). Vorzugsweise können zusätzlich noch
weitere Konzentrationen so gewählt werden, daß in
mindestens einem aliquoten Teil eine hohe
Sondenkonzentration und eine geringe Konzentration an
polarem Reagenz vorhanden ist und besonders bevorzugt
40 zusätzlich in mindestens einem aliquoten Teil eine geringe
Sondenkonzentration und eine hohe Konzentration an polarem

5 Reagenz vorhanden ist (8-Spektren-Analyse). Durch diese
Konzentrationskombination wird sichergestellt, daß die
Transporteigenschaften des Albumins in den verschiedenen
Etappen erfaßt werden, nämlich der physiologische Zustand
beim Binden hydrophober Verbindungen wie z.B. Fettsäuren
10 (geringe Sondenkonzentration und geringe Konzentration an
polarem Reagenz), der physiologische Zustand während des
Transports hydrophober Verbindungen durch das vaskuläre
System (hohe Sondenkonzentration und geringe Konzentration
an polarem Reagenz) und der physiologische Zustand beim
15 Abgeben (Entladen) hydrophober Verbindungen an die
Zielzellen (hohe Sondenkonzentration und hohe
Konzentration an polarem Reagenz).

Während gemäß SU 1319705 lediglich die Bestimmung des
20 Bindungskoeffizienten des Blutplasmas oder Blutserums im
nativen Zustand möglich ist und gemäß EP 0 973 043 A1 der
konkrete native Zustand des Albumins in der zu
untersuchenden Blutprobe bestimmt wird, erfaßt das
erfindungsgemäße Verfahren Veränderungen der Albumin-
25 konformation (Konformationsmobilität) in ihrem zeitlichen
Verlauf unter dem Einfluß eines polaren Reagenzes und
damit die Albuminfunktionalität und Veränderung der
Bindungsparameter von Substraten an das Albumin. Da solche
Veränderungen schon sehr frühzeitig z. B. durch
30 pathologische Prozesse wie z. B. Krebsentstehung, durch
eine medizinische Behandlung, durch Drogenabusus oder auch
während der Fraktionierungsschritte von
Blutplasmabestandteilen und bei inkorrekt Lagerung von
Plasmaderivaten hervorgerufen werden, ist es
35 erfindungsgemäß möglich, schon im frühen Stadium von
Veränderungen der Albuminfunktionalität klare
Diagnoseaussagen zu treffen. In Abhängigkeit von der
physiko-chemischen Charakteristik des Mediums für die ESR-
Analyse werden in den Blutproben die Albuminkonformation
40 und dadurch auch die Bindungseigenschaften einer Reihe von
Substraten am Albumin verändert.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren ist also dadurch gekennzeichnet, daß mittels ESR-Spektroskopie Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins (die Albuminfunktionalität) z.B. im Blut bestimmt werden, indem gezielte Konformationsänderungen des Albuminmoleküls durch verschiedene Konzentrationen an polarem Reagenz in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Spinsonde hervorgerufen werden. Die von den aliquoten Teilen aufgezeichneten ESR-Spektren werden mittels eines mathematischen Modells, das vorzugsweise auf einer Hamilton-Funktion mit axialer Anisotropie basiert, elektronisch simuliert, die experimentellen und simulierten Spektren verglichen und Parameter der Spinsondenbindung an spezifischen Spinsondenbindungsstellen des Albumins elektronisch bestimmt, vorzugsweise durch Minimierung der Quadrate der Differenzen der Spektrenwerte der modellierten und der experimentell gemessenen ESR-Spektren, die diesen Bindungsstellen entsprechen, wobei die ermittelten Parameter der Spinsondenbindung mit biophysikalischen Parametern der Albuminkonformation korrelieren und je nach zu diagnostizierender physiologischer oder pathologischer Veränderung aus den ermittelten Parametern spezifische Parameter selektiert werden und aus diesen Parametern die cut-off-Werte als Entscheidungskriterium mittels einer Diskriminierungsfunktion für die spezifische Modifizierung der Albuminkonformation wie sie bei speziellen pathologischen oder physiologischen Veränderungen auftritt, elektronisch berechnet werden.

35

Erfindungsgemäß wird als Spinsonde eine Verbindung eingesetzt, die eine spezifische Bindung mit dem Albumin eingehen kann, insbesondere Fettsäuren, Steroidhormone oder heterocyclische Kohlenwasserstoffe, die spinmarkiert sein müssen. Auch hydrophobe Verbindungen, die mit Nitroxylradikalen als bekannten Spinsonden markiert sind,

40

5 können im erfindungsgemäßen Verfahren Anwendung finden. In
einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
werden spin-markierte Fettsäuren als Spinsonden
eingesetzt, bevorzugt Doxylstearinsäuren. Ganz besonders
bevorzugt kommt 16-, 5-, 7- oder 12-Doxyl-Stearinsäure zur
10 Anwendung. Werden spin-markierte Fettsäuren als Spinsonden
eingesetzt, so können Parameter der Spinsondenbindung in
den Bindungsstellen 1, 2 und 3 des Albumins bestimmt
werden.

15 Als polares Reagenz kommt Alkohol oder DMSO in Frage,
wobei vorzugsweise ein C₁-C₆-Alkohol eingesetzt wird, ganz
besonders bevorzugt Ethylalkohol.

Als albuminhaltige Probe ist im Sinne der vorliegenden
20 Erfindung z.B. eine Blutprobe oder eine albuminhaltige
Arzneimittel- oder Produktprobe zu verstehen.

Erfindungsgemäß werden die ESR-Spektren mit mindestens
drei, vorzugsweise auch bis zu acht,
25 Spinsondenkonzentrationen aufgezeichnet. Beispielsweise
werden drei Aliquoten einer Serumprobe mit einem Volumen
von je 50 µl mit 16-Doxyl-Stearinsäure in drei
verschiedenen Konzentrationen und mit einem polaren
Reagenz in drei verschiedenen Volumina versetzt, so daß
30 die Endkonzentration der Spinsonde in den zu
untersuchenden Aliquoten $8,33 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $1,55 \cdot 10^{-3}$ mol/l
und $2,41 \cdot 10^{-3}$ mol/l und die Konzentration des polaren
Reagenzes 2,90 mol/l, 3,37 mol/l und 3,80 mol/l beträgt
(siehe Tabelle 1).

35 Die Inkubationszeit beträgt von 7 bis 15 Minuten,
vorzugsweise 10 Minuten. Bei der Inkubation sollte
geschüttelt werden. Die ESR-Spektren werden in der Regel
bei 37°C und dem physiologischen pH-Wert des Blutes
aufgezeichnet. Zur Erhöhung der Präzision können die
40 Spektren bei zwei oder mehr verschiedenen Temperaturwerten

5 der Proben zwischen 15 und 45 °C und/oder bei zwei oder
mehr verschiedenen pH-Werten der Serumproben von 7,5 bis
3,5 aufgezeichnet werden.

10 Die Analyse der gemessenen ESR-Spektren erfolgt
elektronisch mit Hilfe einer speziell entwickelten
Computersoftware für die Molekül-Mobilitäts-Struktur
Analyse (MMS). Die auf der Basis der mindestens drei,
vorzugsweise acht Aliquote einer albuminhaltigen Probe,
vorzugsweise einer Serum- oder Plasmaprobe aufgezeichneten
15 ESR-Spektren werden in die Computersoftware überführt, um
die Parameter der Spinsondenbindung an den verschiedenen
Typen der Bindungsstellen zu berechnen. Die Parameter der
Spinsondenbindungen werden auf der Basis einer ESR-
Spektrensimulation analysiert. Ein ESR-Spektrenmodell,
20 vorzugsweise basierend auf einer Hamilton-Funktion mit
axialer Anisotropie, wird für die Simulation der
experimentell gewonnenen ESR-Spektren verwendet. Die
Parameter der Spinsondenbindung im Albumin beschreiben die
Simulation durch die Minimierung der Quadrate der
25 Differenzen von simulierten und experimentell gewonnenen
ESR-Spektren, wie sie beispielsweise in EP 0 973 043 A1
gezeigt sind.

30 Die Berechnung der Parameter erfolgt separat für die
verschiedenen Typen der Bindungsstellen. Die Parameter,
die die Bindungen der Spinsonde in den Bindungsstellen des
Albuminmoleküls charakterisieren, werden durch ESR-
Spektrensimulation berechnet. Ein Spin-Modell, das
vorzugsweise auf der Hamilton-Funktion mit axialer
35 Anisotropie basiert wird zur Berechnung jeder Komponente
des Spektrums benutzt. Die Berechnung erfolgt wie in EP 0
973 043 A1, Seite 4 unten bis Seite 7 oben beschrieben.

40 Zur mathematischen Verarbeitung des ESR-Spektrums der
Spinsonde wird das o.g. Computerprogramm angewandt, das
den beschriebenen Berechnungsalgorithmus ausführt.

5 Die Zeit zur Verarbeitung eines ESR-Spektrums liegt unter 15 Sekunden.

Als Ergebnis der Simulationsrechnung eines jeden ESR-Spektrums erhält man einen Werteumfang von 48
10 Spinsondenparametern für die drei Albuminbindungsstellen. Jeder von diesen Parametern hat eine spezifische Varianz, korrespondierend zu den Zuständen der an den Albuminmolekülen gebundenen Spinsondenmolekülen, die den Konformationsstatus der Albuminmoleküle widerspiegeln.→
15 Insgesamt werden für den Fall, daß beispielsweise 16-Doxyl-Stearinsäure als Spinsonde dient, die 17 Parameter der Tabelle 2 aus dem Werteumfang selektiert, die den Albuminkonformationsstatus spezifisch charakterisieren.

20 Das Set aus 17 Parametern gemäß Tabelle 2 beschreibt den Zustand der in den Bindungsstellen des Albumins gebundenen Spinsondenmoleküle, die unter dem Einfluß der Bindungseigenschaften der Bindungsstellen den aktuellen Konformationszustand des Albuminmoleküls in Form bio-
25 physikalischer Parameter widerspiegeln.

Aus dem ermittelten Set von 17 Parametern werden die Spinsondenverteilungs- und mobilitätsparameter für die einzelnen Aliquoten gemäß Tabelle 3 berechnet, wobei aus
30 den Parametern der relativen Spinsondenkonzentration des Spinsondenpools C_1 bis C_3 die Verteilungscharakteristika der relativen Anzahl der in den Bindungsstellen gebundenen Spinsondenmoleküle N_1 bis N_3 durch Multiplikation von C_1 bis C_3 mit dem Verhältnis der Konzentrationen von Fettsäure (FS) zu Serumalbumin (SA) berechnet wird.
35

Die Mobilitätscharakteristika der in den Albuminbindungsstellen immobilisierten Spinsondenmoleküle werden gemäß der Formeln aus Tabelle 3 berechnet, wobei
40 die Polaritätsfaktoren der Mikroumgebung der Bindungsstellen 1 und 2 aus den isotropischen Konstanten

5 der HF-Struktur A_1 bzw. A_2 berechnet werden. Die Ausrichtungsfaktoren S_1 und S_2 werden aus den isotropischen Konstanten der HF-Struktur A_1 bzw. A_2 und der jeweiligen Anisotropie der HF-Struktur δA_1 bzw. δA_2 berechnet. Die Korrelationszeiten T'_2 und T''_2 werden aus
 10 den Breiten der Spektrenlinien W_L , W_M und W_H berechnet.

Dabei werden die Bindungsparameter des Albumins vorzugsweise mittels der mathematischen Methode der Regression des Verhältnisses der Bindungsparameter der
 15 Spinsonden in den Aliquoten in Abhängigkeit von der Veränderung der Konzentrationen der Spinsonde und der Konzentrationen des polaren Reagenzes bestimmt. Als Bindungscharakteristika des Albumins wird ein Set der Bindungsparameter der Aliquoten bestehend aus

- 20 • K_B = Bindungskonstante,
- N_1^0 = Kapazität der Fettsäurebindungsstelle 1 und
- C_p = Kritische Konzentration des polaren Reagenzes

mittels Regression des Verhältnisses zwischen der relativen Anzahl der in den Fettsäurebindungsstellen
 25 gebundenen Spinsondendenmoleküle (N_1 , N_2 , N_3) zur Konzentration des polaren Reagenzes (C) gemäß Formel I berechnet:

$$N_3 = \frac{1}{K_B} \cdot \frac{C_p \cdot N_1}{(C_p - C) \cdot (N_1^0 - N_1)} \quad (\text{I}) .$$

30

Als weitere Bindungsparameter des Albumins werden für die einzelnen Aliquoten die Parameter

- R_2 = Ratio der Kapazitäten der Fettsäurebindungsstellen
 2 zu 1 im nativen Zustand des Albumins,
- 35 • K_2 = Flexibilitätsfaktor der Fettsäurebindungsstelle 2,
- L_2 = Limit der Konformationsstabilität des Albumins

mittels Regression des Verhältnisses zwischen der relativen Anzahl der in den Fettsäurebindungsstellen
 gebundenen Spinsondendenmoleküle (N_1 , N_2 , N_3) zur

5 Konzentration des polaren Reagenzes (C) gemäß Formel II ermittelt:

$$N_2 = R_2 \cdot N_1 \cdot (1 + K_2 \cdot C \cdot (L_2 - N_1)) \quad \text{(II)} .$$

10 Die Formeln (I) und (II) beschreiben ein Model der Konformationsflexibilität des Systems der Fettsäurebindungsstellen des Albuminmoleküls, das erfindungsgemäß auf der Basis umfangreicher experimenteller Studien erarbeitet wurde.

15 Die Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins werden aus dem Set der berechneten Bindungsparameter des Albumins für die Aliquoten in Abhängigkeit von den für die Herstellung der Aliquoten angewandten Testbedingungen gemäß Tabelle 4 berechnet. Die vorzugsweise anzuwendenden
20 Testbedingungen ermöglichen die Berechnung der Charakteristika, die die Beladung des Albumins mit Fettsäuren (K_L , N_L^0 - Testbedingung: $C=0$, Quotient Fettsäure / Albumin = 0,5), den Transport von Fettsäuren (N_T^0 , K_T - Testbedingung: $C=0$, Quotient Fettsäure / Albumin = 1,5) und die Entladung der Fettsäuren (D_U , N_U^0 -
25 Testbedingung: $C=3,37$ M, Quotient Fettsäure / Albumin = 1,5) bestimmen. Die Berechnung dieser Charakteristika erfolgt nach folgenden Formeln:

$$\begin{aligned} \text{Integrale Bindungskonstante} &= K_L = K_B \cdot (N_1^0 + N_2^0) , \\ \text{Effektive Beladungskapazität} &= N_L^0 = (N_1^0 + N_2^0) , \\ \text{Effektive Transportkapazität} &= N_T^0 = (N_1^0 + N_2^0) , \\ \text{Integrale Transportbindungskonstante} &= K_T = K_B \cdot (N_1^0 + N_2^0) , \\ \text{Dissoziationskonstante} &= D_U = 1/K_B , \\ \text{Effektive Entladungskapazität} &= N_U^0 = (N_1^0 + N_2^0) . \end{aligned}$$

35 Erfindungsgemäß kann das beschriebene ESR-Verfahren zur Diagnose und/oder Überwachung physiologischer oder pathologischer Veränderungen im menschlichen oder tierischen Körper angewandt werden, z.B. zur frühzeitigen
40 Diagnose von Krebserkrankungen. Für die Diagnose von Krankheiten bzw. physiologischen Veränderungen gehen für

5 die ESR-Screening-Analyse auf der Basis der Auswertung von
mindestens 3 Aliquoten mit unterschiedlichen
Konzentrationen der Spinsonde und des polaren Reagenzes
jeweils bestimmte Bindungsparameter aus Tabelle 2 in eine
Diskriminierungsfunktion ein, um die Cut-off-Werte für die
10 jeweilige zu diagnostizierende Krankheit bzw.
pathologische Veränderung zu bestimmen und mit den cut-
off-Werten von Referenzproben zu vergleichen.

So werden beispielsweise zur Diagnose von Krebser-
15 krankungen die Parameter D_i gemäß Tabelle 5 ermittelt.
Dabei ist bereits einer der Parameter D_1 - D_6 ausreichend,
um eine zuverlässige Diagnose zu treffen. Zur weiteren
Erhöhung der Zuverlässigkeit der Aussagen kann es
vorteilhaft sein, weitere Parameter, insbesondere D_2 , D_3 ,
20 D_5 oder D_6 , oder alle sechs Parameter D_i zu bestimmen. Ist
einer der Parameter $D_i > 1$, so ist die Albuminkonformation
gestört und es handelt sich beispielsweise um eine
onkologische Erkrankung. Ist $D_i < 1$, so hat der Proband
keine onkologische Erkrankung.

25 Die diagnostische Präzision der erfindungsgemäßen
Diagnosemethode wurde an 212 Patienten mit Krebser-
krankungen und an 87 Patienten ohne Krebserkrankungen
überprüft (vgl. Tabelle 6).

30 Tabelle 6 belegt die hohe diagnostische Präzision des
erfindungsgemäßen ESR-Verfahrens von über 90%. Es können
auch Krebserkrankungen in einem sehr frühen Stadium der
Erkrankung diagnostiziert werden. So wird mit der
35 Berechnung von jeweils D_2 , D_3 , D_5 oder D_6 sogar eine höhere
diagnostische Präzision von jeweils ca. 95% erzielt.

Die ESR-Analyse von Blutproben erlaubt somit die Diagnose
von Krebs und anderen Erkrankungen oder physiologischen
40 Veränderungen in sehr frühen Stadien der Erkrankung. Die
Modifikation der Transportfunktion des Albumins basiert

5 auf einer Blockierung der spezifischen Fettsäurebindungsstellen des Albumins, die bereits zu Beginn einer Erkrankung auftritt. Die Folge dieser Bindungsblockierung sind global gestörte Albuminfunktionen und -bindungseigenschaften für die normalen
10 Transportaufgaben, nicht aber für die Versorgung von Neoplasmen und damit eine der Voraussetzungen für deren Wachstum. Die Blockierung an den Fettsäurebindungsstellen führt zu einer erheblichen Mangelversorgung normaler Zellen und auch zu Störungen des Immunsystems. Die mit
15 gegenwärtigen Methoden der klinisch-chemischen Routinediagnostik bestimmbaren Parameter erfassen diese Veränderungen nicht; erste Reaktionen des Organismus auf die Tumorentwicklung sind nur mittels der erfindungsgemäßen ESR-Methode nachweisbar.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl als In-prozess-Kontroll-Parameter bei der Produktion von albuminhaltigen Arzneimitteln als auch zur Bestimmung und Kontrolle der Qualität von albuminhaltigen Präparaten, vorzugsweise
25 Blut- oder Plasmapräparaten, angewandt werden, indem die erfindungsgemäß bestimmten Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins ins Verhältnis gesetzt werden zu den Transporteigenschaften des Ausgangsmaterials und/oder des nativen Serumalbumins gesunder Probanden. Die
30 Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens schließt auch Anwendungen zur Bestimmung der Effektivität verschiedener Verfahren zur Reinigung des Albumins von an das Molekül gebundenen Liganden und die Verfahren wie z.B. Haemosorption und Haemodialyse zur Herauslösung von
35 Endotoxinen, die jeweils Bindungscharakteristika und Transporteigenschaften des Albumins beeinflussen, durch den Vergleich von Ausgangsmaterial und gereinigtem albuminhaltigen Material ein.

40 Die erfindungsgemäße Methode ist kosten- und zeiteffektiv. Sie erlaubt eine automatisierte Bestimmung von

5 verschiedenen ESR-Spektren. Das Ergebnis jedes Screeningtests für 3 Aliquoten liegt innerhalb von weniger als 10 Minuten vor, für die komplexe ESR-Analyse von 8 Aliquoten werden ca. 24 Minuten benötigt.

10 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Testkit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, der eine Mikrotiterplatte mit den fixierten, stabilisierten und exakt dosierten notwendigen unterschiedlichen Konzentrationen an Spinsonde und polarem Reagenz
15 beinhaltet. Der Testkit kann auch lediglich die exakt dosierten Mengen an Spinsonde und polarem Reagenz in Extrakontainern, z.B. versiegelten Probenröhrchen, umfassen, so daß die vordosierten Mengen im Labor den aliquoten Teilen der zu untersuchenden Probe nur noch
20 zugesetzt werden müssen.

Gegenstand der Erfindung ist daneben auch ein ESR-Spektrometer zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens und ein Verfahren zur Erzielung einer hohen
25 Genauigkeit, Stabilität und Sensitivität der ESR-Spektrenaufzeichnung. Das erfindungsgemäße ESR-Spektrometer wird als automatisierter ESR-Analysator den Anforderungen einfacher und zuverlässiger Handhabung in der modernen klinischen Laborpraxis gerecht, indem es
30 automatische Gerätesteuerung, Signalregistrierung und Signalauswertung im Zusammenwirken mit einem Computerprogramm zur diagnostischen Analyse der Meßdaten integriert.

35 Das ESR-Spektrometer 1 zur Realisierung des Verfahrens nach der Erfindung besteht entsprechend der Darstellung in der Fig. 1 aus einem geschirmten Kompakt-Elektromagneten mit Hall-Stabilisierungssystem 2, einem Meßresonator 3, der mit einer homodynem UHF-Einheit 5
40 gekoppelt ist, einer Gerätesteuer- und einer

5 Signalregistriereinheit 9 und einem System der Thermostat-
regelung 7 der Untersuchungsproben.

Die Gerätesteuer- und Signalregistriereinheit 9 besteht
aus zwei Single-Chip-Computern (nicht dargestellt), von
10 denen einer als System-Controller 10 für automatisiertes
Tuning und Stabilisierung dient, während der zweite als
ESR-Signalprozessor 11 den Scann-Algorithmus der Spektren
generiert, die Signaldaten akkumuliert, digital filtert
und aufzeichnet.

15 Für die Aufzeichnung der ESR-Spektren wird die Unter-
suchungsprobe in den Meßschacht des Resonators 3
eingesetzt, in dem die UHF-Wellen vom Haupt-Oszillator der
UHF-Einheit 5 emittiert werden. Das ESR-Signal wird
20 gemessen mittels einer homodynem Waveguide-Einheit als
Quelle der UHF-Strahlung, die durch den Meßresonator 3
reflektiert wird.

Das Magnetfeld, das zur Anregung des ESR-Signals benötigt
25 wird, wird durch den Elektromagneten 2 erzeugt. Die
Spannungsquelle 6 des Elektromagneten 2 wird durch einen
ESR-Signalprozessor 11 geregelt.

Die UHF-Einheit 5 wird geregelt durch die
30 Gerätesteuerereinheit 10, die die feine Frequenzabstimmung
des Meß-resonators 3 mit dem Haupt-Oszillator der UHF-
Einheit 5 gewährleistet, die Thermostatregelung 7 der
Untersuchungsprobe kontrolliert und das ESR-Spektrometer 1
mit dem Personalcomputer 8 des Operators koppelt, der für
35 die Spektrometersteuerung und die Datenanalyse genutzt
wird.

Im Gegensatz zu bekannten ESR-Spektrometern, die nur ein
Tuningelement entweder für die Generator- oder die
40 Resonanzfrequenzabstimmung beinhalten, wobei die
Abstimmung in einem großen Frequenzbereich nur mittels

5 Tuning des Generators ermöglicht wird, während die
Abstimmung des Resonators nur einen kleinen
Frequenzbereich regelt, dafür aber eine stabile Frequenz
bei der Messung verschiedener Proben gewährleistet, ist
das erfinderische Spektrometer mit zwei gekoppelten
10 Steuerungsgeräten, eines für die Steuerung der
Generatorfrequenz sowie ein zweites, für die
Resonanzfrequenz ausgestattet. Das ist erforderlich, um
einerseits eine große Bandbreite der Anwendung zur
Untersuchung verschiedener und verschiedenartiger Proben
15 zu ermöglichen und gleichzeitig die zwingend notwendige
Kongruenz und Reproduzierbarkeit der Charakteristika der
ESR-Spektren bei der Untersuchung aliquoter Proben gemäß
dem erfinderischen Verfahren zu ermöglichen.

20 Eines der Steuerungsgeräte ist auf dem Haupt-Oszillator
der UHF-Einheit 5 installiert zur Frequenzabstimmung im
Bereich von 200-400, vorzugsweise 300 MHz der zentralen
Frequenz von $9,45 \pm 0,5$ GHz. Das zweite Steuerungsgerät
ist auf dem Meßresonator 3 installiert zur Abstimmung der
25 Resonanzfrequenz im Bereich von 10-50, vorzugsweise 30 MHz
mittels einer Resonatorhohlraumvolumenvariation mit Hilfe
einer motorgetriebenen Zugstange.

30 Das Trimmen des Haupt-Oszillators der UHF-Einheit 5 nach
dem Austausch der Untersuchungsproben erfolgt nur, wenn
der Bereich der Resonanzfrequenzabstimmung unzureichend
ist. Das geschieht im Falle eines Wechsels des Typs der
Untersuchungsproben oder im Falle einer wesentlichen
Änderung der Probenvorbereitungsprozedur.

35 Wenn also ein Set von Proben gleichen Typs untersucht
wird, werden deren Spektren praktisch bei einer UHF-
Frequenz aufgezeichnet. In diesem Fall ist die Basis-
(Hintergrund-) Spektrallinie identisch für alle
40 aufgezeichneten Spektren, was sehr wichtig für die

5 Genauigkeit der anschließenden Berechnung der Charakteristika der untersuchten Objekte ist.

Das Thermostatregelungssystem 7 dient der Stabilisierung der Probentemperatur im Bereich von 30°C bis 45°C mit
10 hoher Genauigkeit.

Im Gegensatz zu bekannten ESR-Spektrometern beinhaltet dieses System 7 ein zusätzliches Subsystem in Form einer zusätzlichen, nicht dargestellten Regelungsschleife. Die
15 allgemeine Regelungsschleife des Thermostatregelungssystems 7 besteht aus einem wärmegeregelten Luftstrom, der je nach Erfordernis vorgeheizte oder vorgekühlte Luft in den Resonatorschacht bläst zur Temperaturregelung der Probenampulle.

20 Die zusätzliche Regelschleife des Thermostatregelsystems 7 dient der Präzisionserhöhung der Probentemperaturstabilisierung durch Minimierung der Gradienten innerhalb des Resonatorschachtes. Zu diesem
25 Zweck wird der Resonatorkörper 3 mittels Selbstaufheizung des Magneten durch dessen Wärmestrahlung auf die konkrete Probentemperatur angewärmt. Die Temperatur des Resonatorkörpers 3 wird dazu mittels eines Temperatursensors 4 gemessen. Während der Unterbrechungen der
30 Spektrenaufzeichnungen wird dazu die Spannungsquelle 6 des Elektromagneten 2 auf erhöhte oder reduzierte Werte geschaltet.

Die Struktur und die große Masse des geschirmten Kompakt-
35 Elektromagneten 2 sichert zusätzlich die Thermoisolation des Resonators 3 von Umgebungseinflüssen.

Zur Analyse der ESR-Spektren mittels ESR-Spektrensimulation gemäß dem erfinderischen Verfahren war es im Gegensatz zu bekannten Spektrometern erforderlich,
40 ein spezielles Verfahren der digitalen Filtration zur

5 Gewährleistung der Aufzeichnung einer exakten Form der
Spektren für die Berechnung der Spektrenparameter mittels
Simulation zu entwickeln, da im Gegensatz zu bekannten
Verfahren die Korrelation in dem gemessenen Signal die bei
10 der Filtration von Signalrauschen und Impulsstörungen bzw.
durch Rauschunterdrückung auftreten, minimisiert werden
mußte, um die Anwendung des erfinderischen Spektrometers
für das erfinderische Verfahren durch Gewährleistung der
erforderlichen hohen Genauigkeit der ESR-
15 Spektrenaufzeichnung, der Stabilität und der Sensitivität
des Spektrometers zu gewährleisten.

Dafür generiert der ESR-Signalprozessor einen Algorithmus
des Spektrenscannings mittels Regelung der
Spannungsquelle.

20 Die Ablesungen des ESR-Signals von der UHF-Einheit 5
werden mittels eines Analog/Digital-Konverters mit einer
Frequenz von 10 KHz transformiert und im Speicher des
Signalprozessors 11 akkumuliert.

25 Weil die typische Spektrenscannzeit mehr als eine Minute
beträgt und die Anzahl der Spektrenpunkte weniger als
10.000 beträgt, wird jeder Spektrenpunkt aus 60 oder mehr
Signalablesungen entwickelt.

30 Dessen ungeachtet ist ein bestimmter Teil der
akkumulierten Spektrenablesungen gewöhnlich falsch, da das
ESR-Spektrometer ein ultra-sensitives Instrument ist, das
auf elektromagnetische Störungen oder mechanische
35 Vibrationen reagieren kann.

Eine hohe Sensitivität und Stabilität des erfinderischen
ESR-Spektrometers wird im Gegensatz zu bekannten ESR-
Spektrometern dadurch erreicht, daß ein spezieller
40 Algorithmus der Berechnung jeden Spektrenpunktes angewandt
wird, bei dem N Aufzeichnungen des ESR-Signals S_i ,

5 akkumuliert für jeden Spektrenpunkt, summiert werden mit den speziellen Wichtungsfaktoren k_i . Diese Faktoren verhalten sich invers proportional zu den Quadraten der Messfehler der korrespondierenden Aufzeichnungen.

10 Der Fehler Δ_i der i -ten Signalablesung wird berechnet als die Differenz zwischen dieser Ablesung S_i und dem arithmetischen Mittel der anderen $(N - 1)$ Ablesungen:

$$\Delta_i = \frac{1}{N-1} \left(\sum_{p=1}^N S_p - S_i \right) - S_i$$

15

$$k_i = \frac{1}{(\Delta_i)^2} = (N-1)^2 / \left(\sum_{p=1}^N S_p - S_i \cdot N \right)^2$$

20 Der resultierende Ausdruck für die Berechnung des Signalpunktes lautet

$$S = \left(\sum_{i=1}^N k_i \cdot S_i \right) / \left(\sum_{i=1}^N k_i \right)$$

25 Wenn die Ablesung S_i ein Impulsrauschen enthält, wird der Fehlerwert Δ_i erhöht (z.B. um das Zehnfache) und die korrespondierenden Wichtungsfaktoren k_i werden um ein Vielfaches verringert (z.B. hundertfach). Dadurch werden im erfinderischen ESR-Spektrometer, im Gegensatz zu bekannten ESR-Spektrometern, Ablesungen mit Impulsrauschen von der Aufzeichnung der Spektreninformationen ausgeschlossen. Dieser Algorithmus wird für die Akkumulation eines jeden der gemessenen Punkte des Spektrums angewandt.

35 Im Ergebnis wird eine hohe Sensitivität und Stabilität des aufgezeichneten ESR-Spektrums gewährleistet. Gleichzeitig wird dadurch die Herstellung einer zusätzlichen Korrelation zwischen benachbarten Spektrenpunkten

5 verhindert, die bei bekannten Verfahren der Filtration von ESR-Signalen eine der Hauptursachen der Verringerung der Genauigkeit der Bestimmung der Spektrenparameter mittels Spektrensimulation darstellt.

10 Die gewonnenen ESR-Spektren werden mit Hilfe einer speziellen ESR-Software (MMS) analysiert, wobei das Programm für die ESR-Screeninganalyse einen Meßalgorithmus zur Messung von 3 Aliquoten generiert, und die Ergebnisse gemäß der Vorschrift für die Auswertung anhand der
15 Diskriminierungsfunktionen gemäß Tabelle 5 realisiert.

Für die Durchführung der komplexen ESR-Analyse generiert das Programm einen Meßalgorithmus für 5 bis vorzugsweise 8 Aliquoten, deren Ergebnisse anhand der Vorschrift zur
20 Bestimmung der Transporteigenschaften des Albumins unter Anwendung der mathematischen Methode der Regression realisiert.

Das Programm gewährleistet eine einfache automatisierte Durchführung der Probenmessung und Auswertung ohne eine
25 besondere Ausbildung oder Qualifikation des Meßpersonals zu erfordern.

Nachfolgend wird die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erläutert:

30

Beispiel 1

Untersuchung von Patienten mit onkologischen Erkrankungen
35 und von gesunden Patienten mittels ESR-Screening-Analyse
(3-Spektrenanalyse)

40 Blutserum wird durch Vollblutzentrifugation gewonnen und die Serumproben in drei Aliquote geteilt. Diese Serumproben von jeweils 50 μL werden mit 10, 12 und 14 μL

5 einer alkoholischen Spinsondenlösung versetzt
(Spinsondenendkonzentration $8,33 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $1,55 \cdot 10^{-3}$
mol/L und $2,41 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Die präparierten Mischungen
werden für 10 min bei 37°C unter kontinuierlichem
Schütteln inkubiert.

10

Nach der Inkubation der präparierten Proben werden diese
in drei Kapillaren überführt. Die ESR-Spektren werden für
jede Kapillare im Resonator des ESR-Spektrometers bei
einer konstanten Temperatur von $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ aufgenommen.

15

Jedes aufgenommene ESR-Spektrum ist eine Superposition des
spezifischen Spektrums der Spinsondenmoleküle, die an
verschiedenen Bindungsstellen immobilisiert werden, was
spezifisch für langkettige Fettsäuren ist. Diese
20 Bindungsstellen sind im Serumalbumin des untersuchten
Blutserums lokalisiert.

20

Die drei aufgenommenen ESR-Spektren werden in einen
Computer eingeladen, um die Parameter der
25 Spinsondenbindung zu berechnen. Diese Analyse wird separat
für jede Bindungsstelle mit Hilfe der oben beschriebenen
Methode der ESR-Spektren-Simulation durchgeführt.

25

Tabelle 7 und Fig. 2 enthalten Beispiele für die
30 Bestimmung der (16-DS)-Spinsondenparameter im Serumalbumin
einiger Patienten mit und ohne Karzinomerkrankungen:

30

I. Patienten mit Krebserkrankung

35

1. Patient, study code 506.
Klinische Diagnose: Ösophagus-Karzinom.
2. Patient, study code 507.
Klinische Diagnose: Magen-Karzinom.
3. Patient, study code 528.
- 40 Klinische Diagnose: Mamma-Karzinom.
4. Patient, study code 529.

40

5 Klinische Diagnose: Lungen-Karzinom, .

II. Patienten ohne Krebserkrankung

1. Patient, study code 110, 42 Jahre.
10 Klinische Diagnose: Diffuse Mastopathie. Kein
 histologischer Nachweis für Krebs.
2. Patient, study code 111, 23 Jahre.
Klinische Diagnose: Gesunder Allgemeinzustand.
3. Patient, study code 112, 22 Jahre.
15 Klinische Diagnose: Gesunder Allgemeinzustand.
4. Patient, study code 113, 40 Jahre.
Klinische Diagnose: Rheumatische Herzerkrankung.

20 Tabelle 7 und Fig. 2 belegen, daß sich die gemessenen
Bindungsparameter der Spinsonden für Krebspatienten und
Patienten ohne Krebshinweise nur bei höheren
Alkoholkonzentrationen des polaren Reagenzes unterscheiden
(Serumproben B und C). Diese Unterschiede zeigen eine
spezifische Modifikation der Konformationsmobilität der
25 Serummoleküle in den Blutproben von Patienten mit
Krebserkrankungen.

Beispiel 2

30 Komplexe ESR-Spektrenanalyse (3- und 8-Spektrenanalyse)
der Albumintransportfunktion im Nativserum einer gesunden
Population (Frauen und Männer)

35 Die Serumproben wurden mit einem Volumen von je 50 µL mit
3 resp. 8 verschiedenen Konzentrationen 16-Doxil-
Stearinsäure-Spinsonde (gelöst in Ethylalkohol) gemischt,
so daß Spinsondenendkonzentrationen von $0,83 \cdot 10^{-3}$ mol/L
bis und $2,34 \cdot 10^{-3}$ mol/L und Ethylalkoholendkonzentrationen
40 von 1,86 mol/L bis und 3,8 mol/L resultierten. Der pH-

5 Werte der Serumproben betrug nach der Mischung mit den
Spinsonden $7,4 \pm 0,05$. Die präparierten Mischungen wurden
für 10 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter kontinuierlichem Schütteln
inkubiert und nach der Inkubation in Glaskapillaren zur
ESR-Spektrenaufnahme und -analyse überführt. Die Aufnahme
10 der Spektren erfolgte im erfindungsgemäßen ESR-
Spektrometer. Die ESR-Spektren wurden für jede Kapillare
im Resonator des ESR-Spektrometers bei einer konstant
gehaltenen Temperatur von $37 \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. Für
alle aufgenommenen ESR-Spektren (3 und 8 Spektren) jeder
15 Probe werden im integrierten ESR-Analyser die Parameter
der Spinsondenbindung mit Hilfe der erfindungsgemäßen
Computersoftware berechnet. Für die Simulation der
experimentell gewonnenen ESR-Spektren von verschiedenen
Spinsonden wird ein ESR-Spektrummodell (Hamilton-Funktion
20 mit axialer Anisotropie) verwendet. Die Parameter der
Spinsondenbindung im Serumalbumin beschreiben die
Simulation durch die Minimierung der Quadrate der
Differenzen von simulierten und experimentell gewonnenen
ESR-Spektren. Die Analyse wird separat für jede
25 Bindungsstelle durchgeführt und durch das Computerprogramm
die ESR-Parameter zur Charakteristik der
Albuminfunktionalität und -konformation erstellt.

Die Parameter der Albumintransportfunktion im Nativserum
30 gesunder Blut- und Plasmaspender stehen in Tabelle 8 als
Beispiel für intakte Albumintransportfunktionen. Mit Hilfe
der komplexen ESR-Spektrenanalyse konnten in den
Serumproben dieser gesunden Spender keine Abnormalitäten
festgestellt werden.

5

Beispiel 3:

10

Erweiterte ESR-Spektrenanalyse (3-Spektren- und 3-D-Analyse) der Albumintransportfunktion im Nativserum von Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen (Hämoblastosen, chronisch lymphatische Leukose (CML), Plasmocytom)

15

Blutserum wird durch Vollblutzentrifugation gewonnen und die Serumproben in drei Aliquote geteilt. Diese Serumproben von jeweils 50 μL werden mit 10, 12 und 14 μL einer alkoholischen Spinsondenlösung versetzt (Spinsondenendkonzentration $0,83 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $1,61 \cdot 10^{-3}$ mol/L und $2,34 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Die präparierten Mischungen werden für 10 min bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert.

20

25

Nach der Inkubation der präparierten Proben werden diese in drei Kapillaren überführt. Die ESR-Spektren werden für jede Kapillare im Resonator des erfindungsgemäßen ESR-Spektrometers bei einer konstanten Temperatur von $37 \pm 0,2$ $^\circ\text{C}$ aufgenommen. Die drei aufgenommenen ESR-Spektren werden in einen Computer eingeladen, um die Parameter der Spinsondenbindung zu berechnen. Diese Analyse wird separat für jede Bindungsstelle mit Hilfe der oben beschriebenen Methode der ESR-Spektren-Simulation mittels der erfindungsgemäßen Computersoftware durchgeführt.

30

35

Maligne hämatologische Systemerkrankungen können durch das ESR-Screening erfaßt werden. In Tabelle 9 sind die Diskriminierungsparameter der Serumproben von 5 Patienten

5 mit CML und 3 Patienten mit Plasmocytom dargestellt. Die Diskriminierungsfunktionen D1-D5 ergeben ein typisches Bild für das Vorliegen einer Karzinomerkkrankung, das auch in der 3-D-Analyse der Fettsäurebindungsstellen zum Ausdruck kommt.

10

Beispiel 4:

15

Erweiterte ESR-Spektrenanalyse (3-Spektren- und 3-D-Analyse) der Albumintransportfunktion von albuminhaltigen Arzneimittelproben zur Qualitätskontrolle

20

25

30

35

Die Proben der albuminhaltigen Arzneimittel (Albuminlösungen, gefrorenes Frischplasma) wurden mit einem Volumen von je 50 μL wurden mit 3 resp. 8 verschiedenen Konzentrationen 16-Doxil-Stearinsäure-Spinsonde (gelöst in Ethylalkohol) gemischt, so daß Spinsondenendkonzentrationen von $0,83 \cdot 10^{-3}$ mol/L bis und $2,34 \cdot 10^{-3}$ mol/L und Ethylalkoholendkonzentrationen von 1,86 mol/L bis 3,8 mol/L resultierten. Der pH-Wert der Serumproben betrug nach der Mischung mit den Spinsonden $7,4 \pm 0,05$. Die präparierten Mischungen wurden für 10 min bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert und nach der Inkubation in Glaskapillaren zur ESR-Spektrenaufnahme und -analyse überführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte im erfindungsgemäßen ESR-Spektrometer. Die ESR-Spektren wurden für jede Kapillare im Resonator des ESR-Spektrometers bei einer konstant gehaltenenen Temperatur von $37 \pm 0,2$ °C aufgenommen. Für alle aufgenommenen ESR-Spektren (3 und 8 Spektren) jeder Aliquoten werden im integrierten ESR-Analyser die

5 Parameter der Spinsondenbindung mit Hilfe der
erfindungsgemäßen Computersoftware berechnet. Für die
Simulation der experimentell gewonnenen ESR-Spektren von
verschiedenen Spinsonden wird ein ESR-Spektrummodell
(Hamilton-Funktion mit axialer Anisotropie) verwendet. Die
10 Parameter der Spinsondenbindung im Serumalbumin
beschreiben die Simulation durch die Minimierung der
Quadrate der Differenzen von simulierten und experimentell
gewonnenen ESR-Spektren. Die Analyse wird separat für jede
Bindungsstelle durchgeführt und durch das erfindungsgemäße
15 Computerprogramm die ESR-Parameter zur Charakteristik der
Albuminfunktionalität und -konformation erstellt.

Bei der Herstellung von albuminhaltigen Arzneimitteln ist
die erweiterte ESR-Spektrenanalyse (3-Spektren- und 3-D-
20 Analyse) der Albumintransportfunktion zur Qualitäts- und
Inprozess-Kontrolle geeignet. Die Tabellen 10 und 11
zeigen die prozessbegleitende Anwendung der ESR-
Technologie in der 3- und 8-Spektrenanalyse für
unterschiedlich gewonnene (Vollblutplasma vs.
25 Aphereseplasma) und behandelte (gefilterte =
leukozytendepletierte) Plasmaprodukte (Tabelle 10), sowie
für intaktes und denaturiertes Albumin (Tabelle 11). Es
wird deutlich, daß die Kapazität der
Albumintransportfunktion des Endprodukte (z.B.
30 Albuminlösungen, gefrorenes Frischplasma zur Transfusion)
bewertet werden kann, aber auch einzelne Abschnitte des
Herstellungsprozesses hinsichtlich ihres Einflusses auf die
qualitativen Albumintransporteigenschaften analysiert
werden können.

Tab. 1

**Bevorzugte Konzentrationen der Spinsonde (16
Doxilstearinsäure) und des polaren Reagenzes (Ethylalkohol)**

1. ESR-Screening-Analyse

Bezeichnung der Aliquote	Endkonzentrationen CSpinsonde / CAAlbumin	Endkonzentrationen der Spinsonde, $10^{-3}M$ für Serumalbumin*,	Endkonzentrationen der polaren Reagenz, M**
A	1,6500	0,83	2,90
B	3,2870	1,61	3,37
C	4,9430	2,34	3,80

2. Komplexe ESR-Spektrenanalyse

Bezeichnung der Aliquote	Endkonzentrationen CSpinsonde / CAAlbumin	Endkonzentrationen der Spinsonde, $10^{-3}M$ für Serumalbumin*,	Endkonzentrationen der polaren Reagenz, M**
A	1,6500	0,83	2,90
B	3,2870	1,61	3,37
C	4,9430	2,34	3,80
D	2,3100	1,09	3,80
E	3,8346	1,82	3,80
F	3,2868	0,89	1,86
G	4,9434	1,31	2,14
H	5,0440	1,78	2,90

Zur Darstellung der Grafiken wird ein Punkt (P0) mit den
Endkonzentrationen

P0	1,6500	0,45	1,58
-----------	--------	------	------

durch das Programm gesetzt.

P0 = experimentaler Grenzwert der nativen Konformation des Albumins

*= CAAlbumin für Serum oder Plasma physiologisch 35 - 45 g/l

**= Werte für polares Reagenz Ethylalkohol

Die Matrix der Konzentrationsverteilung der Aliquoten (Beispiel - rel. Anzahl Spinsondenmoleküle
in BS-2) ist in Fig. 3 dargestellt.

Tab. 2: 16-DS-Spinsondenparameter, die von ESR-Spektren ermittelt wurden und ihre Korrelation mit einer Charakteristik der Albuminkonformation und -funktionalität.

Parameter der Spinsondenbindung	Einheit	Bez.	X _t	Biophysikalische Charakteristika
Erste Komponente des Spektrums				Bindungsstelle 1
1. Relative Spinsondenkonzentration	relative Einheit	C ₁	0,6	Spezifische Kapazität der Bindungsstelle
2. Isotropischer g-Faktor	relative Einheit	g ₀₁	2,0	Integrale Charakteristik der Bindungsstellen-Konformation
3. Grad der g-Faktor Anisotropie	relative Einheit	δg ₁	-6, 10E ⁻⁰⁴	Charakteristik der Mikroumgebung der Spinsonde in der Bindungsstelle
4. Isotropische HFS-Konstante	mT	A ₁	1,62	Charakteristik d. Größe d. Bindungsstelle (in inverser Proportion)
5. Grad der HFS Anisotropie	relative Einheit	δA ₁	1,27	Grad der Spinsonden-Ausrichtung
6. Breite der low-field Spektrallinie	mT	W _{L1}	0,28	Charakteristik der Spinsondenmobilität
7. Breite der zentralen Spektrallinie	mT	W _{M1}	0,27	Charakteristik der Spinsondenmobilität
8. Breite der high-field Spektrallinie	mT	W _{H1}	0,31	Charakteristik der Spinsondenmobilität
Zweite Komponente des Spektrums				Bindungsstelle 2
9. Relative Spinsondenkonzentration	relative Einheit	C ₂	0,39	Spezifische Kapazität der Bindungsstelle
10. Isotropischer g-Faktor	relative Einheit	g ₀₂	2,0	Integrale Charakteristik der Bindungsstellen-Konformation
11. Grad der g-Faktor Anisotropie	relative Einheit	δg ₂	8,30E ⁻⁰⁵	Charakteristik der Mikroumgebung der Spinsonde in der Bindungsstelle
12. Isotropische HFS-Konstante	mT	A ₂	1,47	Charakteristik d. Größe d. Bindungsstelle (in inverser Proportion)
13. Grad der HFS Anisotropie	relative Einheit	δA ₂	-0,12	Grad der Spinsonden-Ausrichtung
14. Breite der low-field Spektrallinie	mT	W _{L2}	0,44	Charakteristik der Spinsondenmobilität
15. Breite der zentralen Spektrallinie	mT	W _{M2}	0,32	Charakteristik der Spinsondenmobilität
16. Breite der high-field Spektrallinie	mT	W _{H2}	0,74	Charakteristik der Spinsondenmobilität
Dritte Komponente des Spektrums*				Bindungsstelle 3
17. Relative Spinsondenkonzentration	relative Einheit	C ₃	9,71E ⁻⁰³	Spezifische Kapazität der Bindungsstelle

* Bemerkung: Weil die dritte Komponente des Spektrums mit den Spinsonden in Bindungsstellen niedriger Affinität korrespondiert, sind ihre anderen Charakteristika unbedeutend.

Tabelle 3

Kalkulation der Spinsondenverteilungs- und -mobilitätsparameter					
ESR-Spektren Parameter			Verteilungscharakteristika		
Relative Konzentrationen des Spinsondenpools Spektrum- komponenten			relative Anzahl der in den Bindungsstellen gebundenen Spinsondenmoleküle Bindungs- stelle		
1	C_1	→	1	$N_1 = FS/SA \ C_1$	
2	C_2	→	2	$N_2 = FS/SA \ C_2$	
3	C_3	→	3	$N_3 = FS/SA \ C_3$	
isotropische Konstanten der HF-Struktur			Mobilitätscharakteristika Polaritätsfaktoren der Mikroumgebung		
1	A_1	→	1	$P_1 = \frac{A_{xx}^0 + A_{yy}^0 + A_{zz}^0}{3 \cdot A_1}$	
2	A_2	→	2	$P_2 = \frac{A_{xx}^0 + A_{yy}^0 + A_{zz}^0}{3 \cdot A_2}$	
Anisotropie der HF-Struktur			Ausrichtungsfaktoren		
1	ΓA_1	→	1	$S_1 = \frac{\delta A_1 \cdot A_1 + 1,5 \cdot \left(\frac{1,1 \cdot 10^{-7}}{\tau} \right)^{2/3}}{A_{zz}^0 - \frac{1}{2} \cdot (A_{xx}^0 + A_{yy}^0)} \cdot \frac{1}{P_1}$	
2	ΓA_2	→	2	$S_2 = \frac{\delta A_2 \cdot A_2 + 1,5 \cdot \left(\frac{1,1 \cdot 10^{-7}}{\tau} \right)^{2/3}}{A_{zz}^0 - \frac{1}{2} \cdot (A_{xx}^0 + A_{yy}^0)} \cdot \frac{1}{P_2}$	
Breite der Spektrallinien			Korrelationszeit		
2	W_L	→	2	$T_2' = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot W_M \cdot \left(\frac{W_H}{W_M} + \frac{W_L}{W_M} - 2 \right)$	
2	W_M	→	2	$T_2'' = 6,65 \cdot 10^{-10} \cdot W_M \cdot \left(\frac{W_H}{W_L} - 1 \right)$	
2	W_H	→	2		
			$\left. \begin{array}{l} A_{xx}^0 = 0,59 \text{ mT} \\ A_{yy}^0 = 0,54 \text{ mT} \\ A_{zz}^0 = 3,29 \text{ mT} \\ \tau = 35 \times 10^{-9} \text{ s} \end{array} \right\} \text{ bekannte Konstanten für Nitroxid- FS Spinsonden}$		

Tabelle 4

Bestimmung der Parameter der Transporteigenschaften des Albumins

Charakteristika der FS-Bindungsstellen Flexibilität Funktionale Abhängigkeit der Bindungsparameter	• Bindungskonstante $K_b = B \cdot (C_p - Calc) \cdot 10^7$ • Effektive Kapazität der BS-1 N_1^0 • Effektive Kapazität der BS-2 $N_2^0 = R_2 \cdot (1 - K_2 \cdot Calc \cdot (L_2 - N_1)) \cdot N_1^0$
Charakteristika - Beladung mit Fettsäuren Testbedingungen: (physiologisch normal) $Calc = 0$ $FS/SA = 0,5$	• Integrale Bindungskonstante $K_L = K_b \cdot (N_1^0 + N_2^0)$ Bestimmt die Effektivität einer Molekülladsorption durch das Albumin • Effektive Kapazität $N_L^0 = (N_1^0 + N_2^0)$ Bestimmt die effektive Kapazität für die Beladung
Charakteristika - Transport von Fettsäuren Testbedingungen: (physiologisch normal) $Calc = 0$ $FS/SA = 1,5$	• Effektive Kapazität $N_T^0 = (N_1^0 + N_2^0)$ Bestimmt die effektive Kapazität für den Transport im vaskulären System • Integrale Bindungskonstante $K_T = K_b \cdot (N_1^0 + N_2^0)$ Bestimmt die Fixierung während des Transports im vaskulären System
Charakteristika - Entladung von Fettsäuren Testbedingungen: (Stimulierung der Konformationsänderung des Albumins) $Calc = 3,37 M$ $FS/SA = 1,5$	• Dissoziations Konstante $D_u = 1/K_b$ Bestimmt die Effektivität der Dissoziation • Effektive Kapazität $N_u^0 = (N_1^0 + N_2^0)$ Bestimmt Kapazität des SA für die Absorption von Metaboliten

5 **Tab. 5:** Beispiele der Diskriminierungsfunktionen

Definition* D_i	Beschreibung der Parameter
$D_1 = K_1 \times (y_2 - y_1 + y_3 - y_2),$ wobei $y_1 = C1(A)$, $y_2 = C1(B)$, $y_3 = C1(C)$	Drei Parameter der relativen Spinsondenkonzentration in der Bindungsstelle 1 des Serumalbumins von drei Serumproben A , B und C
$D_2 = K_2 \times (y_3 - y_1 - 0,5),$ wobei $y_1 = C2(A)$, $y_3 = C2(C)$	Zwei Parameter der relativen Spinsondenkonzentration in der Bindungsstelle 2 des Serumalbumins von den Serumproben A und C
$D_3 = K_3 \times (y_2 - y_1 + y_3 - y_2),$ wobei $y_1 = C2(A)$, $y_2 = C2(B)$, $y_3 = C2(C)$	Drei Parameter der relativen Spinsondenkonzentration in der Bindungsstelle 2 des Serumalbumins von drei Serumproben A , B und C
$D_4 = K_4 \times (C3(C) - C3(A) + 0,5)$	Zwei Parameter der relativen Spinsondenkonzentration in der Bindungsstelle 3 des Serumalbumins von den Serumproben A und C
$D_5 = K_5 \times (C1(C) - C1(A) + C2(C) - C2(A) + C3(C) - C3(A))$	Sechs Parameter der relativen Spinsondenkonzentration in verschiedenen Bindungsstellen des Serumalbumins von den Serumproben A und C
$D_6 = 2 - P_2(C) \cdot K_6$	Polaritätsfaktor der Spinsondenumgebung in der Fettsäurebindungsstelle 2 der Serumprobe C

* Die Parameter $C1$, $C2$ und $C3$ sind die Werte der relativen Spinsondenkonzentration jeweils in den Bindungsstellen 1, 2 und 3. Der Polaritätsfaktor P_2 wird berechnet $P_2 = 1,47333 / A_2$ (mT), wobei A_2 die isotropische HFS-Konstante der Fettsäurebindungsstelle 2 darstellt. Die Symbole **A**, **B** und **C** kennzeichnen die Probennummern jeweils einer Serie der gemessenen Serumproben einer untersuchten Blutprobe wie folgt:

- A** - Serumprobe mit einer Spinsondenkonzentration von $8,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l
- B** - Serumprobe mit einer Spinsondenkonzentration von $1,61 \cdot 10^{-3}$ mol/l
- C** - Serumprobe mit einer Spinsondenkonzentration von $2,34 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Die Koeffizienten K_1 bis K_6 sind abhängig von den konkreten Konzentrationen der verwandten Reaktive und vom Ergebnis der Erweiterung und Präzisierung der Daten zu den Parametern des Serumalbumins einer möglichst großen Zahl von Krebspatienten und Gesunden.

Die Koeffizienten K_1 bis K_6 können z.B. die Werte

$K_1 = 7,843$ $K_2 = -1,517$ $K_3 = 6,3$ $K_4 = 1,881$ $K_5 = 3,009$

$K_6 = 1,002$ annehmen.

5

Tab. 6:

10

Diagnostische Präzision von Tests auf der Basis von Diskriminierungsfunktionen im Ergebnis einer klinischen Studie von 212 Patienten mit Krebserkrankungen (Magen-, Ösophagus-, Rektum-, Leber-, Lungen-, Brust-, Prostata-Karzinom) und 87 Patienten ohne Krebserkrankung.

15

Diskriminierungs- funktionen	Sensitivität d. Diagnostik, %	Spezifität d. Diagnostik, %	Präzision d. Diagnostik, %
D ₁	92,3±7,4	92,3±7,4	92,3±7,4
D ₂	96,0±4,0	92,3±7,4	95,0±5,0
D ₃	96,0±4,0	96,0±4,0	96,0±4,0
D ₄	96,0±4,0	84,6±10,0	90,3±7,1
D ₅	96,0±4,0	92,3±7,4	94,2±5,2

Tab. 7:

Bindungsparameter von Spinsonden in den spezifischen Bindungsstellen des Albumins der in den Ausführungsbeispielen und Tab.3 angeführten Patienten mit und ohne Krebserkrankung.

Studien- code	Bindungsparameter* der Spinsonde in den 3 Albumin-Bindungsstellen								
	Serumprobe A			Serumprobe B			Serumprobe C		
	C 1	C 2	C 3	C 1	C 2	C 3	C 1	C 2	C 3
<i>Patienten mit Krebs</i>									
506	0,504	0,476	0,0171	0,495	0,468	0,0328	0,564	0,373	0,0561
507	0,506	0,474	0,0202	0,516	0,444	0,0359	0,665	0,212	0,1092
528	0,453	0,524	0,0218	0,475	0,485	0,0357	0,539	0,401	0,0545
529	0,457	0,521	0,0203	0,528	0,438	0,0295	0,609	0,324	0,0596
<i>Patienten ohne maligne Tumore</i>									
110	0,517	0,469	0,0135	0,512	0,461	0,0251	0,549	0,409	0,0369
111	0,539	0,451	0,0083	0,555	0,425	0,0168	0,579	0,398	0,0193
112	0,514	0,469	0,0161	0,541	0,435	0,0222	0,556	0,412	0,0287
113	0,510	0,471	0,0175	0,519	0,456	0,0215	0,551	0,401	0,0421

*Für jeden der untersuchten Patienten wurden die dargestellten Parameter durch eine ESR-Analyse von drei Serumproben, bezeichnet mit **A**, **B**, **C** bestimmt. Die Proben **A**, **B** und **C** wurden jeweils mit 10 µl, 12 µl und 14 µl alkoholischer Lösung der Spinsonde gemischt (Spinsondenendkonzentration $8,33 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $1,55 \cdot 10^{-3}$ mol/l bzw. $2,41 \cdot 10^{-3}$ mol/l).

Die dargestellten Parameter bezeichnen:

C 1 - Relative Spinsondenkonzentration in der Bindungsstelle 1;

C 2 - Relative Spinsondenkonzentration in der Bindungsstelle 2;

C 3 - Relative Spinsondenkonzentration in der Bindungsstelle 3

Tabelle 8: ESR-Parameter gesunder Personen (16 männlich, 18 weiblich).**Screeningparameter der Albuminfunktionalität**

Parameter	Einheit	Anzahl	Mittelwert	SD
D1	rel. Einh.	32	0,617	0,076
D2	rel. Einh.	32	0,892	0,023
D3	rel. Einh.	32	0,663	0,089
D4	rel. Einh.	32	0,956	0,002
D5	rel. Einh.	32	0,487	0,073

Physiko-chemische Charakteristika der Fettsäurebindungsstellen

Parameter	Einheit	Anzahl	Mittelwert	SD
K_B	10 ⁷ M	32	8,44	0,46
N₁⁰	rel. Einh.	32	10,32	0,11
R₂	rel. Einh.	32	0,87	0,02
C_P	rel. Einh.	32	0,30	0,00
K₂	rel. Einh.	32	1,49	0,11
L₂	rel. Einh.	32	2,43	0,12

Faktoren von Albumin-Transport, -Ladung und -Entladung

Parameter	Einheit	Anzahl	Mittelwert	SD
N₁⁰	rel. Einh.	32	10,32	0,11
N_T⁰	rel. Einh.	32	19,32	0,36
N_L⁰	rel. Einh.	32	19,32	0,36
N_U⁰	rel. Einh.	32	22,24	0,27
K_T	10 ⁷ M	32	150,44	6,95
K_L	10 ⁷ M	32	150,44	6,95
D_U	10 ⁻⁷ M ⁻¹	32	0,06	0,00

Tabelle 9**Screeningparameter der Albuminfunktionalität**

		CLL			Plasmocytom		
Parameter	Einheit	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	SD
D1	rel. Einh.	5	1,134	0,218	3	1,424	0,414
D2	rel. Einh.	5	1,030	0,033	3	1,096	0,085
D3	rel. Einh.	5	1,127	0,138	3	1,402	0,352
D4	rel. Einh.	5	0,980	0,025	3	1,006	0,007
D5	rel. Einh.	5	1,219	0,165	3	1,320	0,337

Tabelle 10: ESR-Parameter von unterschiedlich gewonnenen und behandelten Plasmaprodukten (gefrorenes Frischplasma).

		Vollblutplasma			Aphereseplasma			gefiltertes Plasma		
Parameter	Einheit	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	SD
<u>Screeningparameter der Albuminfunktionalität</u>										
D1	rel. Einh.	21	1,40	0,24	10	2,58	0,65	21	1,72	0,35
D2	rel. Einh.	21	1,10	0,05	10	1,22	0,09	21	1,10	0,05
D3	rel. Einh.	21	1,51	0,20	10	1,91	0,36	21	1,76	0,30
D4	rel. Einh.	21	0,96	0,01	10	0,96	0,01	21	0,97	0,01
D5	rel. Einh.	21	1,21	0,19	10	1,73	0,30	21	1,22	0,17
<u>Physiko-chemische Charakteristika der Fettsäurebindungsstellen</u>										
K _B	10 ⁷ M ⁻¹	21	7,62	1,02	10	16,73	2,80	21	9,18	1,63
N ₁ ⁰	rel. Einh.	21	9,09	0,47	10	6,99	0,59	21	8,93	0,52
R ₂	rel. Einh.	21	0,90	0,05	10	1,12	0,10	21	0,80	0,07
C _P	rel. Einh.	21	0,34	0,01	10	0,32	0,02	21	0,35	0,02
K ₂	rel. Einh.	21	1,72	0,12	10	1,38	0,17	21	2,11	0,17
L ₂	rel. Einh.	21	1,97	0,16	10	0,72	0,47	21	2,29	0,18
<u>Faktoren von Albumin-Transport, -Ladung und -Entladung</u>										
N ₁ ⁰	rel. Einh.	21	9,09	0,47	10	6,99	0,59	21	8,93	0,52
N _T ⁰	rel. Einh.	21	17,3	1,04	10	15,0	1,58	21	16,1	1,19
N _L ⁰	rel. Einh.	21	17,3	1,04	10	15,0	1,58	21	16,1	1,19
N _U ⁰	rel. Einh.	21	18,8	1,05	10	13,6	1,11	21	18,4	1,23
K _T	rel. Einh.	21	117,9	9,7	10	216,3	20,9	21	125,6	15,0
K _L	rel. Einh.	21	117,9	9,7	10	216,3	20,9	21	125,6	15,0
D _U	rel. Einh.	21	0,059	0,006	10	0,041	0,005	21	0,052	0,005

Tabelle 11: ESR-Parameter von intakten und denaturierten Albuminlösungen.

Screeningparameter der Albuminfunktionalität

intaktes Albumin					denaturiertes Albumin	
Parameter	Einheit	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert
D1	rel. Einh.	5	0,239	0,193	1	0,574
D2	rel. Einh.	5	0,784	0,058	1	0,919
D3	rel. Einh.	5	0,105	0,224	1	0,668
D4	rel. Einh.	5	0,989	0,006	1	0,997
D5	rel. Einh.	5	0,170	0,185	1	0,630
Physiko-chemische Charakteristika der Fettsäurebindungsstellen						
K_B	10^7 M^{-1}	K_B	26,5	6,3	1	3,2
N_1^0	rel. Einh.	N_1^0	6,30	0,86	1	11,00
R_2	rel. Einh.	R_2	0,74	0,05	1	0,53
C_P	rel. Einh.	C_P	0,29	0,02	1	0,37
K_2	rel. Einh.	K_2	0,46	0,26	1	1,32
L_2	rel. Einh.	L_2	-3,19	2,73	1	3,06
Faktoren von Albumin-Transport, -Ladung und -Entladung						
N_1^0	rel. Einh.	N_1^0	6,30	0,86	1	11,00
N_T^0	rel. Einh.	N_T^0	10,9	1,57	1	16,8
N_L^0	rel. Einh.	N_L^0	10,9	1,57	1	16,8
N_U^0	rel. Einh.	N_U^0	10,9	1,59	1	19,4
K_T	rel. Einh.	K_T	281	69	1	53
K_L	rel. Einh.	K_L	281	69	1	53
D_U	rel. Einh.	D_U	0,04	0,01	1	0,07

5 **In Fig. 1 bedeuten:**

- 1 ESR-Spektrometer
- 2 Elektromagnet
- 3 Meßresonator
- 10 4 Temperatursensor
- 5 UHF-Einheit
- 6 Spannungsquelle
- 7 Thermostatregelungssystem
- 8 Personalcomputer
- 15 9 Gerätesteuer- und Signalregistriereinheit
- 10 10 Gerätesteuerereinheit
- 11 11 Signalprozessor

20 **Fig. 2** zeigt die induzierte Modifikation der Bindungsparameter von Spinproben in Serumalbumin von Patienten mit und ohne Krebserkrankung als ein Ergebnis des Alkoholeinflusses auf die Albuminmolekülkonformation. Die dargestellten Kurven zeigen die Abhängigkeit der Spinprobenparameter von der Alkoholkonzentration in der Serumprobe.

- 25 A) Serumprobe enthält 50 μL Serum, 10 μL der alkoholischen Spinprobenlösung mit einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^{-2}$ mol/L, Spinprobenendkonzentration $8,33 \cdot 10^{-4}$ mol/L
- 30 B) Serumprobe enthält 50 μL Serum, 12 μL der alkoholischen Spinprobenlösung mit einer Konzentration von $0,8 \cdot 10^{-2}$ mol/L, Spinprobenendkonzentration $1,55 \cdot 10^{-3}$ mol/L
- 35 C) Serumprobe enthält 50 μL Serum, 14 μL der alkoholischen Spinprobenlösung mit einer Konzentration von $1,1 \cdot 10^{-2}$ mol/L, Spinprobenendkonzentration $2,41 \cdot 10^{-3}$ mol/L
- [110]...[529]: Study codes der Patienten.

Fig. 3 zeigt bevorzugte Konzentrationen der Spinsonde (16 Doxilstearinsäure) und des polaren Reagenzes (Ethylalkohol).

5

Patentansprüche

1. Verfahren zur ESR-spektroskopischen Bestimmung von Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins in einer albuminhaltigen Probe, bei dem in der zu untersuchenden Probe gezielte Konformationsänderungen des Albuminmoleküls induziert werden, indem aliquoten Teilen der Probe mindestens drei unterschiedliche Konzentrationen einer mit dem Albumin bindenden Spinsonde und zusätzlich mindestens drei unterschiedliche Konzentrationen eines polaren Reagenzes zugesetzt werden, anhand der ESR-Spektren der mit Spinsonde und polarem Reagenz versetzten aliquoten Teile der Grad der Veränderung der Bindungsparameter der Spinsonde an spezifische Bindungsstellen des Albumins in Abhängigkeit von der Spinsondenkonzentration und der Konzentration an polarem Reagenz mittels Computersimulation der ESR-Spektren bestimmt wird und die Veränderungen der Transporteigenschaften des Albumins aus den Veränderungen der Werte der Bindungsparameter der Spinsonde für die durch die unterschiedlichen Konzentrationen an Spinsonde und polarem Reagenz induzierten Konformationszustände des Albumins berechnet werden, wobei die zuzusetzenden Konzentrationen an Spinsonde so ausgewählt werden, daß der Mittelwert des Verhältnisses der Konzentration der Spinsonde zur Konzentration des Albumins $2,5 \pm 0,5$ beträgt und ausgehend von diesem Mittelwert mindestens zwei zusätzliche Konzentrationen ausgewählt werden, deren Abweichung von diesem Mittelwert nicht geringer als 1,0 ist, und die zuzusetzenden Konzentrationen an polarem Reagenz so ausgewählt werden, daß der Mittelwert der Endkonzentration des polaren Reagenzes $(0,6 \pm 0,25) \cdot C_p$ beträgt, wobei C_p die kritische Konzentration des polaren Reagenzes darstellt, dessen Überschreitung

40

5 zur Denaturierung des Albumins führt, und ausgehend
von diesem Mittelwert mindestens zwei zusätzliche
Konzentrationen an polarem Reagenz ausgewählt werden,
deren Abweichung von diesem Mittelwert mindestens 15%
10 beträgt, wobei die Konzentrationen an Spinsonde und
polarem Reagenz, die den jeweiligen aliquoten Teilen
der Probe zugesetzt werden, innerhalb der angegebenen
Konzentrationsbereiche so gewählt werden, daß
mindestens in einem aliquoten Teil eine geringe
15 Sondenkonzentration und eine geringe Konzentration an
polarem Reagenz, in mindestens einem aliquoten Teil
eine mittlere Konzentration an polarem Reagenz und
eine mittlere Konzentration an Spinsonde und in
mindestens einem aliquoten Teil eine hohe
20 Sondenkonzentration und eine hohe Konzentration an
polarem Reagenz vorhanden sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
zusätzlich noch weitere Konzentrationskombinationen
25 an Spinsonde und polarem Reagenz so gewählt werden,
daß in mindestens einem aliquoten Teil eine hohe
Sondenkonzentration und eine geringe Konzentration an
polarem Reagenz vorhanden ist.

30 3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
zusätzlich noch weitere Konzentrationskombinationen
an Spinsonde und polarem Reagenz so gewählt werden,
daß in mindestens einem aliquoten Teil eine geringe
35 Sondenkonzentration und eine hohe Konzentration an
polarem Reagenz vorhanden ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
40 als albuminhaltige Probe eine Blutprobe oder eine
Arzneimittelprobe eingesetzt wird.

5

5. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Spinsonde eine Verbindung eingesetzt wird, die
eine spezifische Bindung mit Albumin eingeht,
10 vorzugsweise spinmarkierte Fettsäuren, besonders
bevorzugt Doxylstearisinsäuren.

15

6. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
als polares Reagenz Alkohol oder DMSO eingesetzt
wird, vorzugsweise Ethylalkohol.

20

7. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Parameter der Spinsondenbindung von Aliquoten
einer Blutprobe bei unterschiedlichen Temperaturen
von 15 bis 45°C und/oder bei unterschiedlichen pH-
Werten von 7,5 bis 3,5 bestimmt werden

25

8. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsparameter des
Albumins mittels der mathematischen Methode der
Regression des Verhältnisses der Bindungsparameter
der Spinsonden in den Aliquoten in Abhängigkeit von
30 der Veränderung der Konzentrationen der Spinsonde und
der Konzentrationen des polaren Reagenzes bestimmt
werden und aus diesen Bindungsparametern die
Veränderung der Transporteigenschaften des Albumins
berechnet wird.

35

9. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
es zur Diagnose und/oder Überwachung physiologischer
oder pathologischer Veränderungen im menschlichen oder
40 tierischen Körper angewandt wird, indem aus den
ermittelten Bindungsparametern des Albumins je nach zu

- 5 diagnostizierender physiologischer oder pathologischer
Veränderung spezifische Parameter, vorzugsweise die
Verhältnisse der relativen Spinsondenkonzentrationen
C1, C2, C3 in den Fettsäurebindungsstellen zwischen
den Aliquoten bestimmt und diese mit den mittels
10 Diskriminierungsfunktion ermittelten cut-off-Werten
von Referenzproben verglichen werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, daß
15 es zur Diagnose und/oder Überwachung onkologischer
Erkrankungen angewandt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
20 einer oder mehrere der Parameter D_i gemäß Tabelle 5
ermittelt werden, wobei eine onkologische Erkrankung
vorliegt, wenn einer der Parameter $D_i > 1$ ist.
12. Verfahren nach Anspruch 1,
25 dadurch gekennzeichnet, daß
es zur Bestimmung und Kontrolle der Qualität von
albuminhaltigen Präparaten, vorzugsweise Blut- oder
Plasmapräparaten, angewandt wird, indem die gemäß
Anspruch 1 bestimmten Veränderungen der
30 Transporteigenschaften des Albumins ins Verhältnis
gesetzt werden zu den Transporteigenschaften des
Ausgangsmaterials und/oder des nativen Serumalbumins
gesunder Probanden.
- 35 13. Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach den
Ansprüchen 1 bis 12, bestehend aus einer
Kunststoffplatte mit einer Vielzahl von Kavitäten,
vorzugsweise einer Mikrotiterplatte, deren Kavitäten
fixierte, stabilisierte und exakt dosierte
40 unterschiedliche Konzentrationen an Spinsonde und
polarem Reagenz enthalten.

5

14. Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 12 umfassend in Probencontainern exakt dosierte Konzentrationen an Spinsonde und polarem Reagenz.

10

15

15. ESR-Spektrometer zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 12, bestehend aus einem geschirmten Kompakt-Elektromagneten mit Hall-Stabilisierungssystem (2), einem Meßresonator (3), der mit einer UHF-Einheit (5) mit geregelter Haupt-Oszillator zur Frequenzabstimmung in einem ersten Bereich von 200 bis 400 MHz der zentralen Frequenz von $9,45 \pm 0,5$ GHz gekoppelt ist, einer Gerätesteuer- und einer Signalregistriereinheit (9) und einem System zur Thermostatregelung (7) der Untersuchungsproben, wobei zur Regelung des Meßresonators (3) bezüglich der Kompensation des Frequenzunterschieds bei der Spektrenregistrierung der Aliquoten einer Untersuchungsprobe der Meßresonator (3) mit einem weiteren Steuergerät für die Abstimmung der Resonanzfrequenz in einem zweiten Bereich von 10 bis 50 MHz mittels einer Resonatorhohlraumvolumenvariation gekoppelt ist.

20

25

30

16. ESR-Spektrometer nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Thermostatregelungssystem (7) eine zusätzliche Regelungsschleife zur Präzisionserhöhung der Proben-temperaturstabilisierung durch Minimierung der Gradienten innerhalb des Resonatorschachtes durch elektromagnetische Selbstaufheizung enthält, die durch Regelung der Stromzufuhr zum Elektromagneten dessen Selbstaufheizung während der Unterbrechungen der Spektrenabtastung steuert, dessen Wärmeabstrahlung den Resonator erwärmt.

35

40

5

17. ESR-Spektrometer nach den Ansprüchen 15 und 16,
dadurch gekennzeichnet, daß
der Resonatorkörper (3) mit einem Temperatursensor
(4) zur Regelung der elektromagnetischen
10 Selbstheizung des Elektromagneten verbunden ist,
welche die Aufheizung des Resonators bis zur
konkreten Proben temperatur vornimmt.

15

20

25

30

35

18. Verfahren zur Erzielung einer hohen Genauigkeit,
Stabilität und Sensivität der ESR-Spektren-
aufzeichnung mit dem ESR-Spektrometer nach den
Ansprüchen 15 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, daß
in der Signalregistriereinheit (9) die registrierten
ESR-Signaldaten zur Erzielung einer hohen Genauigkeit
bei der Computersimulation der ESR-Spektren
verarbeitet werden, indem die SignalDatenkorrelation,
die bei der Filtration des Signalrauschens und der
Impulsstörungen entsteht, durch digitale Filtration
der aufgezeichneten ESR-Signale reduziert wird, wobei
die Berechnung jeden Spektrenpunktes mittels eines
speziellen Algorithmus erfolgt, nach welchem N
Aufzeichnungen des ESR-Signals S_i für jeden
Spektrenpunkt akkumuliert und mit speziellen
Wichtungsfaktoren k_i summiert werden, wobei sich die
Wichtungsfaktoren k_i invers proportional zu den
Quadraten der Meßfehler der korrespondierenden
Aufzeichnungen verhalten entsprechend den Ausdrücken

$$k_i = (N-1)^2 / \left(\sum_{p=1}^N S_p - S_i \cdot N \right)^2$$

und

$$S = \left(\sum_{i=1}^N k_i \cdot S_i \right) / \left(\sum_{i=1}^N k_i \right) .$$

40

1/3

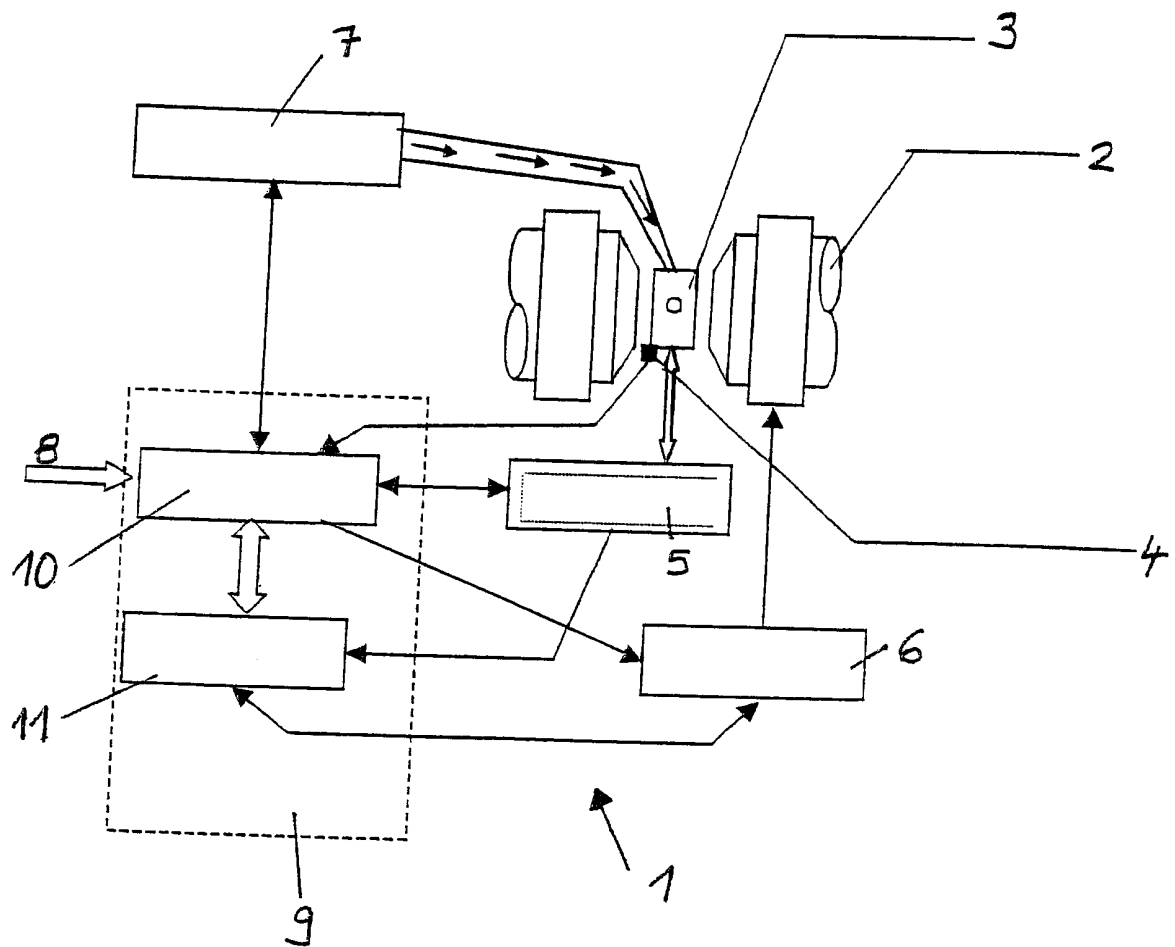
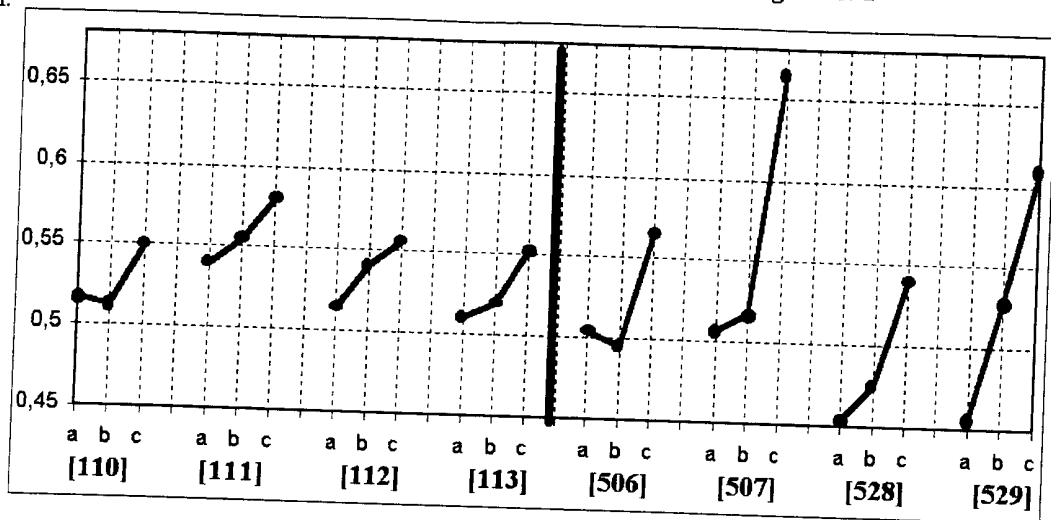


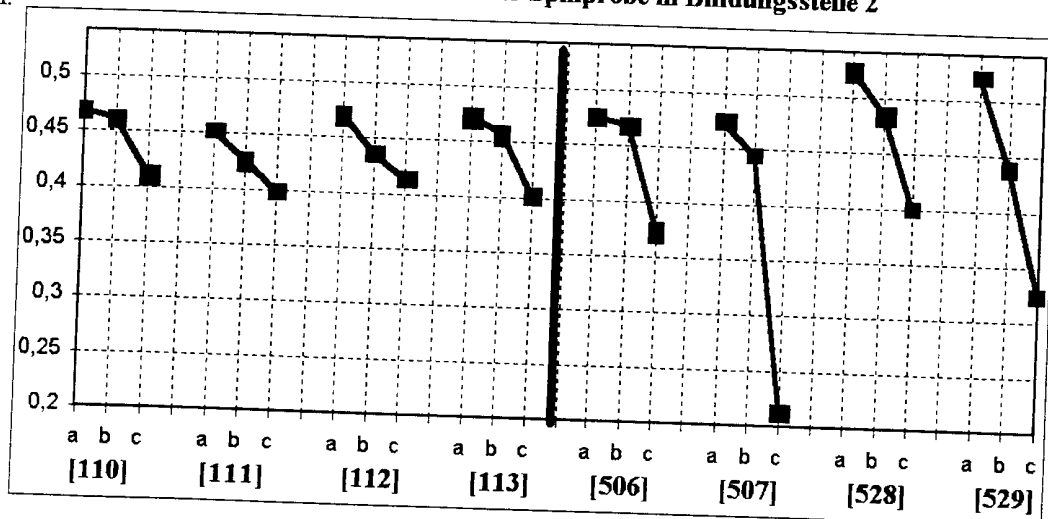
Fig. 1

C1
rel. Einh.

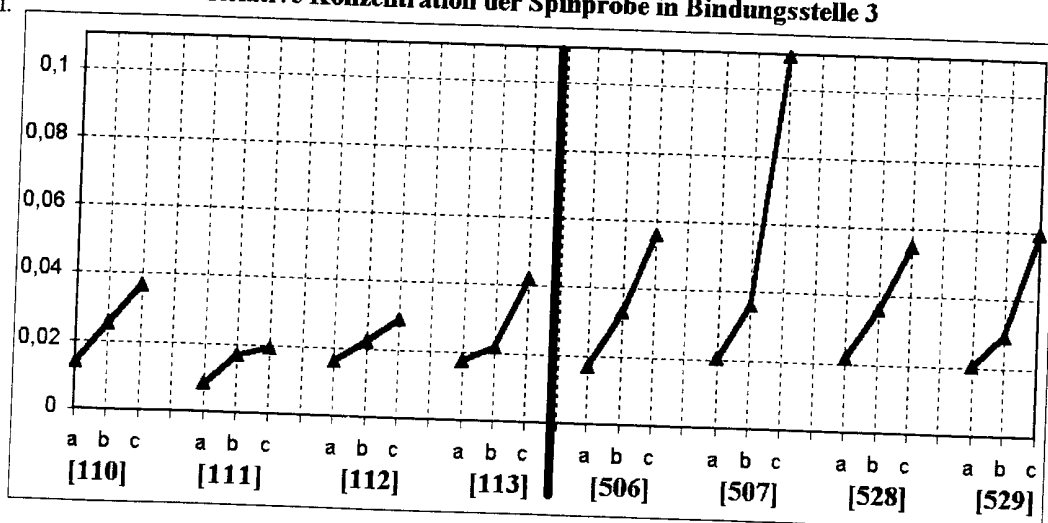
Relative Konzentration der Spinprobe in Bindungsstelle 1

C2
rel. Einh.

Relative Konzentration der Spinprobe in Bindungsstelle 2

C3
rel. Einh.

Relative Konzentration der Spinprobe in Bindungsstelle 3



Patienten ohne maligne Tumore

Patienten mit Krebs

Fig. 2

3/3

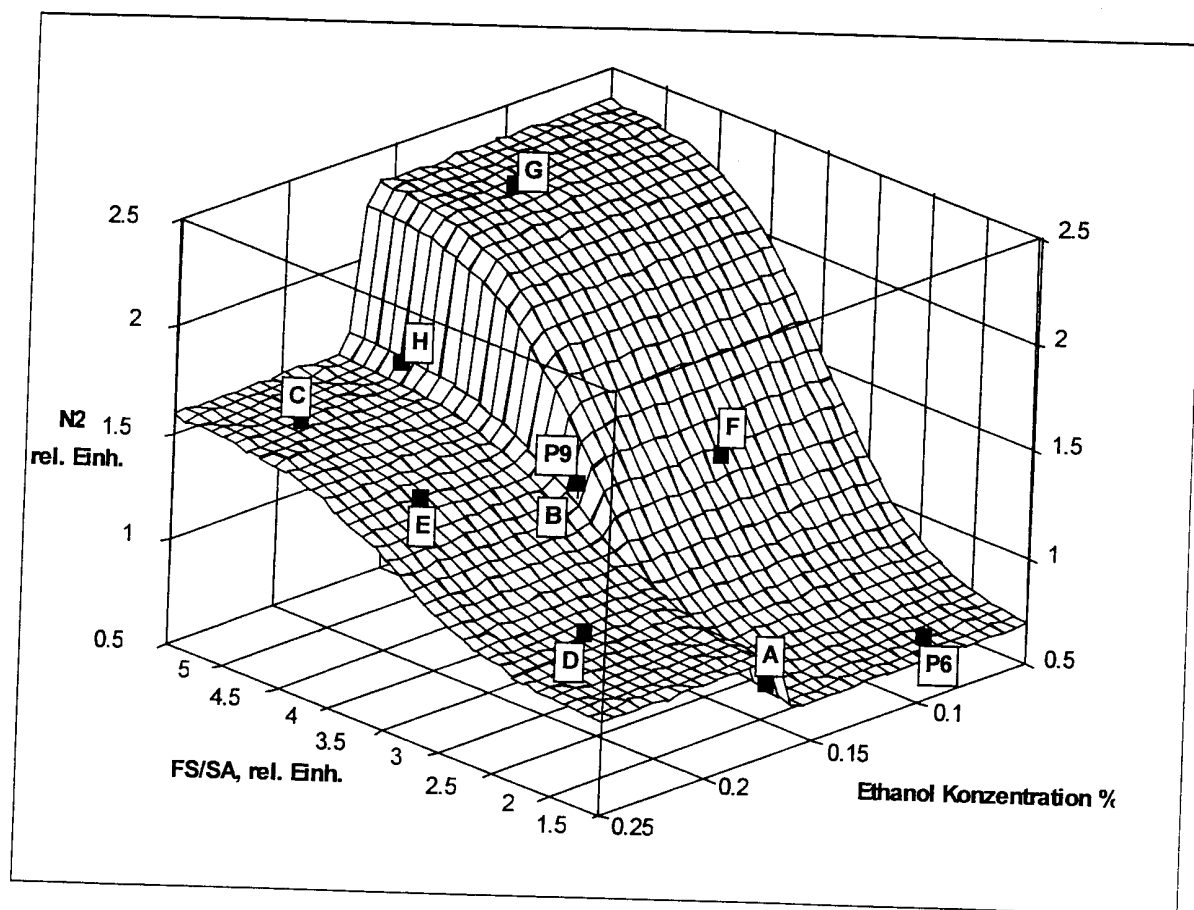


Fig. 3