



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 09 533 T2** 2005.01.27

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 222 468 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 09 533.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/28635**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 970 956.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/027611**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.10.2000**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **19.04.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.07.2002**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **31.03.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.01.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **G01N 33/68**  
**G01N 33/543**

(30) Unionspriorität:  
**417292 13.10.1999 US**

(73) Patentinhaber:  
**Incyte Corp., Palo Alto, Calif., US**

(74) Vertreter:  
**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und  
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:  
**JOHANN, Timothy, Palo Alto, US; IRAO, Sheila,  
Palo Alto, US**

(54) Bezeichnung: **MULTIPLE ANALYSE VON ZYTOKINEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Das Gebiet der Erfindung ist die Analyse von Cytokinen.

[Hintergrund]

**[0002]** Cytokine sind Signalproteine, die auf vielen verschiedenen Gebieten der Forschung und bei der Diagnose und klinischen Behandlung von Krankheiten wichtig sind. Z.B. steuern Cytokine die Entzündungsantwort des Körpers auf eine Infektion. Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8 und Interleukin-12 sind entzündungsfördernde Cytokine, die an einer Sepsis beteiligt sind. Entzündungshemmende Cytokine, wie Interleukin-4 und Interleukin-10 werden ebenfalls als Antwort auf eine Infektion gebildet, um die entzündliche Reaktion zu verringern. Die Überwachung von Serumgehalten dieser und anderer Cytokine kann ein Maß für die Immunaktivität des Wirtes liefern. Z.B. haben verschiedene klinische Untersuchungen einen statistischen Zusammenhang zwischen TNF- $\alpha$ -gehalten und der Schwere einer Infektion gezeigt. Ferner hat die Forschung gezeigt, dass unterschiedliche Pathogene einzigartige Muster der Cytokinexpression zeigen. Diese Daten zeigen, dass Cytokine ausgezeichnete molekulare Marker für die Diagnose einer septischen Entzündungsantwort sind.

**[0003]** Die derzeitigen Methoden der Wahl für die Analyse der Cytokinexpression in Blutproben sind quantitative RT-PCR und ELISA. Die quantitative RT-PCR misst den Gehalt an Cytokin-mRNA in interessierenden Zellen. Diese Methode erfordert das Extrahieren von mRNA aus Zellen und macht somit viel Vorbereitungsarbeit vor der Bestimmung erforderlich. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses Assays ist auch der kapitalintensive Schritt (erfordert die teure RT-PCR-Vorrichtung), was die Erhöhung des Durchsatzes dieses Assays ernsthaft beschränkt. Zur Zeit können nur zwei Cytokine durch eine Bestimmungsreaktion durch quantitative RT-PCR nachgewiesen werden, was ebenfalls den potenziellen Durchsatz dieses Assays begrenzt. ELISA misst andererseits direkt die Konzentration an Cytokinprotein in Serum oder Zellüberständen. ELISA-Assays erfordern keine Vorbereitung vor der Bestimmung. Der kapitalintensive Schritt (Nachweis) ist bei ELISA nicht der längste Schritt, was ebenfalls einen potenziellen größeren Durchsatz als bei quantitativer RT-PCR erlaubt. Diese Assays messen jedoch nur die Konzentration eines Cytokins pro Reaktion, was ihren Durchsatz beschränkt.

**[0004]** R.T. Carson & D.A.A. Vignali (1999), J. Immunol. Meth. 227, 41–52 beschreiben ein auf Mehrstrom-Cytometrie beruhendes Assay zur simultanen quantitativen Bestimmung von 15 Cytokinen, bei dem Einfangkörper, von denen jeder für ein bestimmte Cytokin spezifisch ist, auf Perlen immobilisiert sind. Sets von Perlen, die Perlen umfassen, die mit unterschiedlichen Antikörpern überzogen sind, werden in eine Anordnung von dicht verschlossenen Röhrchen gegeben.

**[0005]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Antikörper-Anordnungs-Technologie – ein sehr wirksames Mittel zur parallelen Analyse von mehreren Genprodukten auf den Proteingehalt. Diese Technologie ergänzt diejenige von DNA-Mikroanordnungen, indem sie die Analyse von post-transkriptionellen Regulationsereignissen erleichtert. Speziell liefert die Erfindung ELISA-artige Bestimmungen, bei denen die Konzentrationen von mehreren Proteinen, wie Cytokinen, pro Reaktion bestimmt werden.

**ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

**[0006]** Die Erfindung liefert Methoden und Zusammensetzungen zur simultanen quantitativen Bestimmung von Cytokinen in einer Probe. Bei den Methoden wird eine Festphasenanordnung angewandt, umfassend eine Mehrzahl von verschiedenen Antikörpern, die in entsprechenden diskreten Anordnungselementen angeordnet sind und für eine entsprechende Mehrzahl von unterschiedlichen Cytokinen spezifisch sind. Bei speziellen Ausführungsformen sind die Cytokine ausgewählt aus GM-CSF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12, TNF $\alpha$ , APO-1, sICAM-1, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL3, IL5, IL13, IL15, IL16, MCP-1, SAA und sVCAM-1; die Mehrzahl beträgt zumindest fünf, vorzugsweise zumindest acht, insbesondere 11; die Antikörper sind monoklonal; jeder Antikörper ist an ein anderes der entsprechenden Cytokine gebunden und die Anordnung ist eine Mikroanordnung auf einem Kunststoff- oder Glas-Substrat, die durch Kontaktabscheidung hergestellt worden ist. Die Erfindung liefert auch Methoden zur Herstellung und Anwendung der Anordnungen zur simultanen quantitativen Bestimmung von Cytokinen in Proben.

**BESCHREIBUNG VON SPEZIELLEN AUSFÜHRUNGSFORMEN DER ERFINDUNG**

**[0007]** Die folgenden Beschreibungen spezieller Ausführungsformen und Beispiele werden zur Erläuterung

und keinesfalls zur Beschränkung angegeben. Soweit es nicht unsinnig oder anders angegeben ist, bedeutet bei diesen Ausführungsformen und in der ganzen Beschreibung der Ausdruck "ein" bzw. "eine" ein oder mehrere und der Ausdruck "oder" bedeutet "und/oder".

**[0008]** Bei den Methoden werden Festphasenanordnungen von cytokin-spezifischen Antikörpern angewandt, die in entsprechenden diskreten Anordnungselementen angeordnet sind. Die Anordnungselemente sind diskrete Bereiche einer Substratoberfläche, in fluider Verbindung, so dass alle Elemente der Anordnung in einem einzigen kontinuierlichen Medium inkubiert, gewaschen usw. werden können. Daher unterscheidet sich die Anordnung von Assayformaten, bei denen jeder spezifische Antikörper in diskreten für Flüssigkeit getrennten Vertiefungen zur Inkubation getrennt angeordnet ist, wie in einer Mikrotiterplatte.

**[0009]** Die Antikörperanordnungen können nach einer Anzahl von bekannten Methoden auf einer großen Vielfalt von Substraten, wie Glas, Silicon, Kunststoffen, Nylonmembranen usw. erzeugt werden, einschließlich einer Kontaktabscheidung, z.B. US-PS 5 807 522, 5 770 151 usw.; Methoden auf Basis von Strömungswegen, z.B. US-PS 5 384 261; auf Nanolithographie mit einem eingetauchten Stift beruhende Methoden, z.B. Piner et. al., Science 29. Jan 1999: 661–663 usw., usw. S. auch die gleichzeitige USSN 09/150 502, die Kapillar-Drucksysteme beschreibt, die zur Erzeugung von Antikörperanordnungen angewandt werden können. Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden die Antikörper in entsprechenden diskreten Elementen in hoher Dichte angeordnet, d.h. in Mikroanordnungen von mindestens 100, vorzugsweise mindestens 1000, insbesondere mindestens 10000, vor allem mindestens 100000, diskreten Elementen pro Quadratzentimeter.

**[0010]** Die Antikörper können intakt oder Fragmente, gereinigt oder durch Rekombination exprimiert, monoklonal oder polyklonal sein und können durch Affinität gereinigt worden sein. Bei einer speziellen Ausführungsform ist jeder cytokin-spezifische Antikörper der Anordnung ein monoklonaler Antikörper. Die Antikörper können für eine Mehrzahl eines weiten Bereichs von Cytokinen, insbesondere Lymphokinen, spezifisch sein. Geeignete Cytokine können in gereinigter oder rekombinierter Form aus handelsüblichen Quellen erworben, von kommerziell und/oder allgemein zugänglichen Klonen exprimiert und/oder von Geweben gereinigt werden. Bei einer speziellen Ausführungsform haben die Cytokine eine native menschliche Sequenz, obwohl Homologe von einer großen Vielfalt von Tierarten, insbesondere Säugetierarten (z.B. Mäuse) häufig verfügbar sind und angewandt werden können. Eine unerwartete Feststellung im Rahmen der Erfindung war, dass eine Mehrzahl von unterschiedlichen Cytokinen simultan in der gleichen, einzigen Inkubation gemessen werden konnte, insbesondere, wenn die Mehrzahl mindestens fünf, vorzugsweise mindestens acht, insbesondere mindestens elf, unterschiedliche Cytokine beträgt. Beispiele für Cytokine mit menschlichen Sequenzen, von denen gezeigt werden konnte, dass sie die nachgewiesen werden können, sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Cytokine, von denen gezeigt wurde, dass sie in Mehrfach-Immunoassays spezifisch quantitativ bestimmt werden können.

|                               |            |                               |                                |             |                            |
|-------------------------------|------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------|----------------------------|
| <b>GM-CSF</b>                 | <b>IL4</b> | <b>IL10</b>                   | <b>SICAM-1<sup>1</sup></b>     | <b>IL5</b>  | <b>MCP-1<sup>2</sup></b>   |
| <b>IL1<math>\alpha</math></b> | <b>IL6</b> | <b>IL12</b>                   | <b>IFN-<math>\alpha</math></b> | <b>IL13</b> | <b>SAA<sup>3</sup></b>     |
| <b>IL1<math>\beta</math></b>  | <b>IL7</b> | <b>TNF<math>\alpha</math></b> | <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | <b>IL15</b> | <b>SVCAM-1<sup>4</sup></b> |
| <b>IL2</b>                    | <b>IL8</b> | <b>APO-1</b>                  | <b>IL3</b>                     | <b>IL16</b> |                            |

<sup>1</sup>Interzelluläres Adhäsionsmolekül

<sup>2</sup>anziehendes Makrophagen-Protein

<sup>3</sup> Serum-Amyloid A

<sup>4</sup>Lösliches vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül

**[0011]** Folglich können die angegebenen Anordnungen angewandt werden, um solche Moleküle simultan quantitativ in Proben zu bestimmen. Eine große Vielfalt von Cytokin enthaltenden Proben kann der Analyse nach diesen Methoden unterworfen werden, z.B. Serum, Urin, Cerebral/Spinal-Flüssigkeit usw. Ferner kann die Technologie mit Antikörperanordnungen, im Gegensatz zu Methoden auf PCR-Basis, die Genexpression in Proben messen, die keine RNA enthalten. Diese bessere Zugänglichkeit führt zu der Möglichkeit, detaillierte statistische Untersuchungen mit Antikörperanordnungen durchzuführen, die mit anderen Assays nicht möglich sind.

**[0012]** Die Inkubations- und Waschbedingungen werden, wie unten gezeigt, leicht empirisch bestimmt, so dass die vorgesehene Mehrzahl von Cytokinen simultan in einem einzigen Inkubationsmedium bestimmt werden kann. Es kann eine große Vielfalt von Methoden angewandt werden, um die spezifisch gebundenen Cy-

tokin-Analyten nachzuweisen, einschließlich direkt markierte cytokin-spezifische Antikörper-Reagenzien, Sandwich-Immunoassays, Cytokin-Rezeptor-Bindungsassays usw. Tabelle 2 zeigt verschiedene Gruppen von Cytokinen, die simultan nach beispielhaften Methoden bestimmt werden können.

Tabelle 2: Spezifische quantitative Bestimmung von Cytokinen in Mikro-Anordnungs-Immunoassays

| Beisp. | Antikörper                            | Spezifität                                                                                      | Anordnung                                      | Nachweisart                                               | Spezifische quantitative Bestimmung |
|--------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 12     | Mabs                                  | IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL12                                                     | Polystyrol, geringe Dichte, Kontaktabscheidung | Sandwich-Assay HRP-STR                                    | +, +, +, +, +, +                    |
| 16     | Durch Affinität gereinigt, polyklonal | IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12                                | Glas, hohe Dichte, Kontaktabscheidung          | <sup>3</sup> H-markierter cytokin-spezifischer Antikörper | +, +, +, +, +, +, +, +, +           |
| 25     | Mabs                                  | GM-CSF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12, TNF $\alpha$          | Glas, hohe Dichte, Kontaktabscheidung          | Sandwich-Assay HRP-STR                                    | +, +, +, +, +, +, +, +, +           |
| 27     | Mabs                                  | GM-CSF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12, TNF $\alpha$          | Nylon, hohe Dichte Inkinjekt-Abscheidung       | Sandwich-Assay Rhodamin-Konjugat                          | +, +, +, +, +, +, +, +, +           |
| 33     | Mabs                                  | GM-CSF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12, TNF $\alpha$          | Polystyrol, hohe Dichte, Kontaktabscheidung    | Sandwich-Assay HRP-STR                                    | +, +, +, +, +, +, +, +, +           |
| 51     | Mabs                                  | APO-1, sICAM-1, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL3, IL5, IL13, IL15, IL16, MCP-1, SAA, SVCAM-1 | Glas, hohe Dichte, Kontaktabscheidung          | Sandwich-Assay HRP-STR                                    | +, +, +, +, +, +, +, +, +           |
| 55     | Mabs                                  | GM-CSF, TNF $\alpha$ , APO-1, sICAM-1, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, SAA, sVCAM-1      | Glas, hohe Dichte, Kontaktabscheidung          | Sandwich-Assay HRP-STR                                    | +, +, +, +, +, +, +, +, +           |
| 62     | Mabs                                  | IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12, IL3, IL5, IL13, IL15, IL16    | Glas, hohe Dichte, Kontaktabscheidung          | Sandwich-Assay HRP-STR                                    | +, +, +, +, +, +, +, +, +           |
| 86     | Mabs                                  | Tabelle 1 Cytokine                                                                              | Polystyrol, hohe Dichte, Kontaktabscheidung    | Sandwich-Assay HRP-STR                                    | +, +, +, +, +, +, +, +, +           |

#### BEISPIELHAFTE VERSUCHSPROTOKOLLE

**[0013]** Unter Anwendung der folgenden Arbeitsweisen wurde ein Antikörperanordnungs-Prototyp zur simultanen Bestimmung von 11 unterschiedlichen Cytokinen in Serum und Zellüberständen aufgebaut. Dieses Assay beruhte auf einem ELISA-Sandwich-Format mit Chemoluminiszenz-Nachweis. Der Chemoluminiszenz-Nachweis erfordert im Gegensatz zum Fluoreszenz-Nachweis, keine Anregung der Probe und ermöglicht die simultane Messung von einigen unterschiedlichen Anordnungen gleichzeitig, was zu einer wesentlichen Zunahme des Durchsatzes führt. Elf unterschiedliche Cytokine wurden erfolgreich simultan quantitativ bestimmt und die Messwerte durch Vergleich mit RT-PCR-Assays verifiziert.

**[0014]** Aufbau der Anordnung. Einfang-Antikörper (Biosource International) von 11 Cytokinen (GM-CSF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12 und TNF $\alpha$ ) wurden in einer Konzentration von 0,5 mg/ml direkt auf den Boden von 12-Loch-Platten (Corning), die vorher zur optimalen Bindung von Antikörpern überzogen worden waren als Punkte aufgebracht. Mit Biotin behandeltes Rinderalbumin wurde in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml als Bezugsmaterial aufgebracht. Die Anordnungselemente hatten einen Durchmesser von grob 1000  $\mu$ m mit einem Abstand von Mitte zu Mitte von 3000  $\mu$ m. Nachdem die Proben aufgebracht waren, wurden die Platten sofort abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Anordnungen wurden dann viermal mit einer Lösung von PBS (10 mM Phosphat, 2,7 mM Kaliumchlorid, 137 mM Natriumchlorid, pH 7,4) und 0,1% Tween-20 (Sigma) gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Platten wurden dann 2 h bei Raumtemperatur mit einer Lösung, enthaltend 150 mM Natrium, 4 mM Kalium, 140 mM Phosphat (pH 7,4) und 5% BSA blockiert.

**[0015]** Bedingungen der Bestimmung. Die BSA-Lösung wurde von jeder Anordnung entfernt und viermal mit einer Lösung von 0,005% Tween-20 in PBS gewaschen. 1 ml Probe wurde dann auf jede Anordnung aufgebracht und unter Schütteln (120 UpM) 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden entfernt und die Anordnungen viermal mit 0,005% Tween-20 in PBS gewaschen. 1 ml einer Lösung, enthaltend mit Biotin behandelte Antikörper gegen jedes der 11 Cytokine (GM-CSF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12 und TNF $\alpha$ ) in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ml in 150 mM Natrium, 4 mM Kalium, 140 mM Chlorid, 10 mM Phosphat (pH 7,4) und 10% BSA, wurde in jede Vertiefung gegeben und unter Schütteln 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper-Lösung wurde entfernt und 1 ml Meerrettichperoxidase/Streptavidin-Konjugat (HRP-STR), 0,2  $\mu$ g/ml in HPE-Verdünnungspuffer (Research Diagnostics Inc.) wurde zu jeder Anordnung zugegeben und 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die HRP-STR-Lösung wurde entfernt und die Anordnungen viermal mit 0,005% Tween-20 in PBS gewaschen. SuperSignal™ (Pierce) Chemolumineszenz-Substrat wurde 1:1 mit gelieferter Peroxid-Lösung vermischt; 500  $\mu$ l dieses Gemisches wurden zu jeder Anordnung zugegeben und die gesamte Platte simultan mit einem gekühlten Peltier-CCD-Kamera-Abbildungssystem (Chemilmager™ 4000, Alpha Innotech Co.) abgebildet. Ein Röntgenfilm kann ebenfalls als Nachweis-system angewandt werden. Die Daten können mit irgendeinem üblichen Bildanalyseprogramm quantifiziert werden.

**[0016]** Menschliche THP-1-Zellen. Die Zelllinie THP-1 von menschlicher akuter monocytischen Leukämie, die bei dieser Untersuchung verwendet wurde, wurde in einem Feuchtigkeitsinkubator, der 5% CO<sub>2</sub> enthielt, bei 37°C gehalten. Diese Zellen wuchsen in RPMI-1640-Medium (Gibco BRL) gehalten, das mit 10% fötalem Kälberserum (Gibco BRL), Glucose (4,5 g/l),  $5 \times 10^{-5}$  M b-Mercaptoethanol, 1 mM Natrium-pyruvat, Streptomycin (100 mg/ml) und Penicillin (100 E/ml) ergänzt war. Die Zellen wurden in 6-Loch-Zellkultur-Platten, 5 ml je Platte, mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in komplettem RPMI1640-Medium verteilt. Vor der Aktivierung der Zellen mit E.coli oder P.aeruginosa als Entzündungs-Stimuli wurden die Zellen 48 h mit  $1,6 \times 10^{-9}$  M Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Sigma) behandelt. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen 8 h mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $1 \times 10^1$ – $10^5$  Zellen/ml) von exponentiell gewachsenen E.coli und P.aeruginosa Bakterienzellen behandelt. Sowohl die Zellüberstände als auch die Zellperle wurden gesammelt und für spätere Cytokin-Bestimmungen und RNA-Isolierung/RT-PCR-Nachweis von Cytokin mRNA bei –80°C aufbewahrt.

**[0017]** Isolierung von RNA. Die angewandte RNA-Isolierungs-Methode mit TRIzol-Reagens (Gibco BRL) ist im wesentlichen wie von Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987, Anal. Biochem. 162: 156–159) entwickelt. Die gefrorenen Zellperlen (etwa  $2,5 \times 10^6$  Zellen) wurden durch erneutes Suspendieren in 1 ml TRIzol-Reagens (Gibco BRL) und wiederholtes Pipettieren lysiert. Dann wurden 200  $\mu$ l Chloroform zugegeben und die Proben wurden durch 15 s langes Verwirbeln kräftig vermischt. Nach dem Zentrifugieren der Proben mit 14000 UpM während 15 min bei 4°C wurde die farblose obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, in ein frisches RNase-freies Röhrchen überführt. Die RNA wurde durch Vermischen mit 0,5 ml Isopropylalkohol aus der wässrigen Phase ausgefällt. Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie 10 min mit 7500 UpM bei 4°C zentrifugiert wurden. Die RNA-Perle wurde einmal mit 0,5 ml 75%igem Ethanol gewaschen, bevor sie 10 min an der Luft trocknen konnte. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde durch Messung von OD<sub>260</sub> in 2 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8,0) in einem Spektrophotometer und durch Agarosegel-Elektrophorese bestimmt.

**[0018]** RT-PCR-Nachweis von Cytokin-RNS. Das in dieser Arbeit angewandte RT-PCR-Assay ist im wesentlichen wie an anderer Stelle beschrieben (Murphy et al., 1993, J. Immunol. Methods, 162: 211–223). Oligonucleotid-Primer, die auf einen 206-bp-Bereich des menschlichen IL-6-Gens (Zilberstein et al., 1986, EMBO J. 5: 2529–2537) gerichtet sind, wurden angewandt, um IL-6 spezifische mRNA in behandelten THP-1-Zellen nachzuweisen. Diese IL-6-spezifischen Primer waren auf der Basis der NCBI-Sequenz für das menschliche IL-6-Gen (Zugangsnummer X04430) ausgebildet. Oligonucleotid-Primer, die auf einen 107-bp-Bereich des

menschlichen IL-1 $\beta$ -Gens (Nishida et al., 1987) gerichtet sind, wurden angewandt, um IL-1 $\beta$  spezifische mRNA in nicht behandelten und behandelten THP-1-Zellen nachzuweisen. Diese IL-1 $\beta$ -spezifischen PCR-Primer waren Basis der NCBI-Sequenz für das menschliche IL-1 $\beta$ -Gen (Zugangsnummer M15330) ausgebildet. Alle Primer wurden von Operon (Alameda, CA) hergestellt. RT (Umkehr-Transkriptase) Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l, enthaltend 1  $\mu$ g Gesamt-RNA und die von PE Applied Biosystems (Foster City, CA) in dem TaqMan Gold RT-PCR-Kit gelieferten Komponenten, durchgeführt. RT-Reaktionen wurden wie in der Kit-Anleitung angegeben durchgeführt. Für die folgende PCR-Reaktion wurde 1  $\mu$ l der RT-Reaktionsprobe in einem Endvolumen von 30  $\mu$ l, enthaltend alle von PE Applied Biosystems in dem TaqMan Gold RT-PCR-Kit gelieferten Komponenten, verwendet. PCR-Reaktionen wurden wie in der Kit-Anleitung angegeben durchgeführt. 10  $\mu$ l jedes PCR-Produktes wurden auf ein 3% NuSieve/1% SeaKem GTG-Agarosegel (FMC BioProducts, Rockland, ME) in 1  $\times$  TBE-Puffer aufgebracht und anschließend wurde eine Elektrophorese 30 bis 45 min bei 200 V durchgeführt.

### Patentansprüche

1. Eine Festphasenanordnung, umfassend wenigstens fünf verschiedene Antikörper, die in entsprechenden diskreten Anordnungselementen in fluider Verbindung angeordnet sind und für entsprechende fünf verschiedene Cytokine spezifisch sind, worin jeder Antikörper für ein entsprechendes Probencytokin spezifisch und daran gebunden ist, um eine quantitative Detektion der Probencytokine zu ermöglichen.
2. Eine Anordnung gemäß Anspruch 1, umfassend wenigstens zehn verschiedene Antikörper, die in entsprechenden diskreten Anordnungselementen angeordnet sind und für entsprechende zehn verschiedene Cytokine spezifisch sind, wobei jeder Antikörper für ein entsprechendes Probencytokin spezifisch und quantitativ daran gebunden ist.
3. Eine Anordnung gemäß Anspruch 1 oder 2, worin die Cytokine aus der Tabelle 1 ausgewählt sind.
4. Eine Anordnung gemäß Anspruch 1 oder 2, worin die Cytokine ausgewählt sind aus: GM-CSF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12 und TNF $\alpha$ .
5. Eine Anordnung gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4, worin die Antikörper monoklonal sind.
6. Ein Verfahren zur simultanen, quantitativen Detektion von Cytokinen in einer Probe, wobei das Verfahren den Schritt des Inkontaktbringens der Probe mit einer Festphasenanordnung umfasst, die wenigstens fünf verschiedene Antikörper umfasst, die in entsprechenden diskreten Anordnungselementen in fluider Verbindung angeordnet sind und für entsprechende fünf verschiedene Cytokine spezifisch sind, wobei wenigstens fünf verschiedene entsprechende Probencytokine simultan quantitativ gemessen werden.
7. Ein Verfahren gemäß Anspruch 6, worin die Anordnung wenigstens zehn verschiedene Antikörper umfasst, die in entsprechenden diskreten Anordnungselementen angeordnet sind und für entsprechende zehn verschiedene Cytokine spezifisch sind, wobei wenigstens zehn verschiedene entsprechende Probencytokine simultan quantitativ gemessen werden.
8. Ein Verfahren gemäß Anspruch 6 oder 7, worin die Cytokine aus der Tabelle 1 ausgewählt sind.
9. Ein Verfahren gemäß Anspruch 6 oder 7, worin die Cytokine ausgewählt sind aus: GM-CSF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12 und TNF $\alpha$ .
10. Ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6, 7 oder 8, worin die Antikörper monoklonal sind.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen