

Entwicklung eines homogenen Suspensionsimmunoassays auf der Basis magneto-optischer Relaxationsmessungen

Die präzise Detektion von spezifischen Biomarkern kann ausschlaggebend sein für die Diagnose einer Erkrankung, zur Patientenklassifizierung oder die Überwachung einer Arzneimitteltherapie. Dafür verwendete Immunoassays und Immunosensoren sind allgemein anerkannte, selektive, einfache und relativ preisgünstige serologische Methoden. Durch die Einbeziehung der Nanotechnologie in immunometrische Methoden werden die bei Neuentwicklungen derzeit im Vordergrund stehenden Ziele wie die Erhöhung der Sensitivität sowie die simultane Bestimmung mehrerer strukturell verwandter Analyten realisiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendbarkeit des in der Arbeitsgruppe entwickelten Messverfahrens der magneto-optischen Relaxation von Ferrofluiden in einem homogenen magneto-optischen Suspensionsimmunoassay (MOSIA) zu demonstrieren. Dieses Verfahren nutzt die Messung der Relaxationszeit von zuvor durch ein äußeres Magnetfeld ausgerichteten magnetischen Nanopartikeln (MNP) zur Bestimmung von Partikelgrößen.

Um MNP zu ermitteln, die als geeignete Generalsignatoren im MOSIA fungieren können, wurden sieben verschiedene biologisch kompatible Ferrofluide hinsichtlich ihrer Größe und Größenverteilung mithilfe der magneto-optischen Relaxationsmessung charakterisiert. Die untersuchten Partikelsuspensionen zeigten deutlich heterogene mittlere Partikelgrößen und Verteilungsbreiten. Die vorrangig in dieser Arbeit verwendeten Carboxydextran-umhüllten Maghämipartikel (Nanopart[®] 040) wiesen eine sehr schmale Verteilungsbreite sowie einen eher geringen hydrodynamischen Durchmesser auf. Diese Eigenschaften prädestinieren diese MNP für eine erfolgreiche Detektion mithilfe magneto-optischer Relaxationsmessungen.

Durch Amin-reaktive Methoden (Reduktive Aminierung, EDC/NHS-Methode) gelang es, die Hüllen von DDM128N und Polyasparaginsäure-umhüllten Magnetitpartikeln erfolgreich mit Streptavidin zu funktionalisieren. Damit standen universell mit biotinylierten Proteinen koppelbare Partikel zur Verfügung. Unter Ausnutzung der extrem stabilen Streptavidin-Biotin-Bindung konnten die biotinylierten polyklonalen und monoklonalen Antikörper der bereits in der klinischen Diagnostik verwendeten Biomarker Eotaxin, karzinogen-embryonales Antigen (*carcinogen embryonic antigen, CEA*), Insulin sowie Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor-1 (*insulin like growth factor-1, IGF-1*) mit den Oberflächen von DDM128N konjugiert werden.

Die spezifische Bindungsfähigkeit der auf diese Weise hergestellten Antikörper-konjugierten MNP wurde in qualitativen Bindungsstudien mit dem entsprechenden Antigen in Phosphatpuffer durch Anstieg des Partikeldurchmessers infolge der Entstehung von Partikelaggregaten nachgewiesen. Des Weiteren wurden diese Bindungsstudien gleichermaßen in biologischen Matrices wie humanem Plasma verschiedener Konzentration durchgeführt. Dies führte bereits vor Zugabe des Vernetzungsagens zu einer unspezifischen Partikelaggregation. Durch den Einsatz von sogenannten *blocking agents* wie Rinderserumalbumin und Polysorbat 20 wurde die unspezifische Aggregation teilweise unterdrückt, so dass Bindungsstudien auch in verdünntem humanem Plasma erfolgreich durchgeführt werden konnten.

Zur Quantifizierung der Proteininteraktionen wurden Bindungsstudien mit verschiedenen Antigenkonzentrationen verwirklicht, die zu einem systematischen Anstieg des Partikeldurchmessers in Abhängigkeit der zugegebenen Antigenmenge führten. Um

kinetische Aspekte der untersuchten Antikörper-Antigen-Interaktionen im Rahmen des MOSIA zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Modelle entwickelt. Das Monomer-Dimer-Modell geht davon aus, dass sich Antikörper-konjugierte MNP über ein Antigen in Form von Dimeren organisieren. Höhere Aggregate werden nicht berücksichtigt. Dies impliziert, dass dieses Modell nur für sehr geringe Reaktionsumsätze gültig ist. Das Relaxationssignal wird mithilfe dieses Modells in zwei Teile zerlegt, so dass die Entstehung von Monomeren und Dimeren wiedergegeben werden kann. Das lineare Polymerisationsmodell beschreibt die Aggregatbildung der MNP als Formierung linearer Ketten. Zunächst wird hierbei die Größenverteilung der funktionalisierten MNP von der Proteininteraktion mit einer Normalverteilung charakterisiert. Anschließend wird der Umsatz der Antikörper-Antigen-Interaktion mit fortschreitender Reaktionszeit ermittelt, aus dem die Gleichgewichtskonstante K_D sowie die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_a und Dissoziation k_d bestimmt werden können. Mit beiden Modellen resultieren vergleichbare K_D für die untersuchten Antikörper-Antigen-Systeme, die auch innerhalb der in der Literatur beschriebenen Bereiche für diese Systeme liegen.

Die Kinetikparameter K_D , k_a und k_d der Proteinsysteme wurden in dieser Arbeit ebenso mit der Oberflächenplasmonenresonanzmethode (SPR, BIAcore[®]) bestimmt. Für die polyklonalen und monoklonalen Eotaxin- und CEA-Systeme konnten K_D -Werte ermittelt werden, die im gleichen Größenordnungsbereich wie die des MOSIA liegen. Für das IGF-1-System jedoch unterscheiden sich die nach beiden Methoden bestimmten Parameter erheblich.

Im Hinblick auf einen künftigen Routineeinsatz in analytischen Laboren wurde der MOSIA nach den Richtlinien der *International Conference of Harmonization* (ICH) in Bezug auf die untersuchten Proteinsysteme validiert. Die Nachweis- und Erfassungsgrenzen liegen derzeit für die Bestimmung von Eotaxin und CEA noch über den physiologischen und pathologischen Plasmaspiegeln *in vivo*. Die Bestimmung von entsprechenden IGF-1-Konzentrationen ist jedoch schon möglich. Grundsätzlich können in Zukunft Nachweis- und Erfassungsgrenze der Proteinsysteme durch Optimierung der Küvettengeometrie im Aufbau des magneto-optischen Relaxationsapparats um den Faktor 100 verringert werden.

Die Bestimmung der magneto-optischen Relaxation von magnetischen Nanopartikeln stellt demzufolge eine geeignete Methode zur Charakterisierung von Ferrofluiden sowie Proteininteraktionen in Form eines homogenen magneto-optischen Suspensionsimmunoassays dar. Neben den allgemeinen Vorteilen eines homogenen Immunoassays qualifizieren apparative Vorteile wie die geringe Größe des Messgerätes sowie die fehlende Notwendigkeit der magnetischen Abschirmung die Methode für einen möglichen Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik der täglichen Laborroutine.

Konstanze Aurich, März 2007