



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 29 674 T2 2008.06.05**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 261 875 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/68** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 29 674.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP01/02894**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 931 527.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/067108**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.03.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **13.09.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.12.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **01.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.06.2008**

(30) Unionspriorität:

0005683	10.03.2000	GB
0006064	14.03.2000	GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:

Université de Genève, Geneve, CH

(72) Erfinder:

**Hochstrasser, Denis Francois, CH-1245 Geneva,
CH; Sanchez, Jean-Charles, CH-1208 Geneva, CH;
Zimmermann, Catherine Gabrielle, CH-1286
Geneva, CH; Guillaume, Elisabeth, F-74100
Annemasse, FR**

(74) Vertreter:

Kador & Partner, 80469 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR DIAGNOSE VON TRANSMISSIBLEN SPONGIFORMEN ENCEPHALOPATHIEN**

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

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Bereich der Erfindung

[0001] Diese Erfindung ist auf dem Gebiet eines diagnostischen Assays, wobei ein Protein und ein Antikörper dagegen verwendet werden.

Beschreibung des Stands der Technik

[0002] Die übertragbaren spongiösen Enzephalopathien (TSEs) sind neurodegenerative Erkrankungen des Zentralnervensystems. Sie können übertragen werden, vererbt werden oder treten sporadisch auf und werden in Tieren, z.B. als bovine spongiöse Enzephalopathie (BSE) bei Rindern oder als Traberkrankheit bei Schafen, sowie beim Menschen als Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom, letale familiäre Insomnie oder Kuru beobachtet. Sie haben eine lange Inkubationszeit, führen zur Ataxie, Demenz, psychiatrischen Störungen und zum Tod. Die neuropathologischen Veränderungen schließen eine Vakuolisierung des Hirngewebes, Astrogliose und Amyloid-Plaquetbildung ein. Die Erkrankungen sind pre mortem schwer zu diagnostizieren.

[0003] Die Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) von CJD-Patienten weist bei einer zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese zwei zusätzliche Polypeptide auf [Harrington, M.G. New England Journal of Medicine 315, 279 (1986), Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C.J., Lee, K.H. & Harrington, M. B. New England Journal of Medicine 335, 924 (1996).] Die Funktion dieser 14-3-3 Polypeptide bei der TSE bleibt unklar. Sie können in einem pre mortem Test für die diagnostische CJD-Beurteilung verwendet werden, haben aber eine geringe Spezifität.

[0004] Es sind monoklonale Antikörper für die abnormale Form des Prionenproteins erhältlich und sie können in einem enzymgekoppelten Immunoassay verwendet werden, wie es in den PCT-Beschreibungen WO 98/23962 und 98/32710 und von Schmerr, M.J., The Beckman Coulter Pace Setter Newsletter 3(2), 1-4 (Juni 1999) beschrieben ist, diese Verfahren sind jedoch noch nicht vollständig entwickelt.

[0005] Die Entwicklung von neuen nicht invasiven CJD- und BSE-Blutmarkern würde den Ärzten helfen eine frühe Diagnose zu stellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass zwei Fettsäurebindungsproteine (FABP), bekannt als Herztyp (H-FABP) und Gehirntyp (B-FABP) Fettsäurebindungsprotein, Marker für TSEs sind. Folglich stellt die Erfindung einen diagnostischen Assay für eine TSE oder die Möglichkeit einer solchen in einer verdächtigen Körperflüssigkeitsprobe bereit, welcher die Bestimmung der Konzentration des Herztyp oder Gehirntyp Fettsäurebindungsproteins (H-FABP oder B-FABP) in der Probe umfasst. Das Verfahren ist speziell auf die Diagnose der CJD, insbesondere der neueren Variante CJD, in humanen Patienten und auf BSE in wiederkäuenden Tieren wie Rindern anwendbar.

[0007] Das Verfahren wird in geeigneter Weise unter Verwendung eines Antikörpers gegen H-FABP oder B-FABP durchgeführt, wobei das Ausmaß der Reaktion zwischen dem Antikörper und dem FABP in der Probe untersucht wird und mit der Konzentration des FABP in der Probe in Beziehung gesetzt wird. Die auf diese Weise erhaltene Konzentration wird verwendet, um eine Diagnose zu stellen oder bei einer Diagnose zu helfen.

[0008] Die vorliegende Erfindung ermöglicht es einen Assay mit hoher Sensitivität, Spezifität und einer vorhersagbaren Genauigkeit für die CJD durchzuführen. Die „Sensitivität“ wird als der Prozentsatz der echt Positiven definiert, die der Assay an Proben ergibt, die von Patienten entnommen wurden, in welchen eine klinische Untersuchung eine CJD bestätigt hat. Die „Spezifität“ meint den Prozentsatz von echt Negativen, die sich durch den Assay an Kontrollproben ergeben, d.h. von Patienten, in welchen eine klinische Untersuchung keine CDJ offenbart hat. Die „vorhersagbare Genauigkeit“ meint das Verhältnis der echt Positiven zu den Gesamtpositiven (echt + falsch), ausgedrückt als ein Prozentsatz.

[0009] H-FABP ist ein bekannter Marker für den akuten Myokardinfarkt (AMI), siehe Ishii, J. et al., „Serum concentrations of myoglobin vs human heart-type cytoplasmic fatty-acid binding Protein in early detection of acu-

te myocardial infarction", *Clinical Chemistry* 1997; 43 1372–1378. Deshalb ist es wünschenswert, um einen Assay für H-FABP für die Diagnose einer CJD im Menschen mit einem größeren Vorteil zu nutzen, eine weitere Assayart für AMI durchzuführen (einen, in welchem der Marker nicht ein FABP ist), um aus der Diagnose für eine CJD jene Patienten auszuschließen, die in dem AMI-Assay positiv sind.

[0010] Folglich stellt die Erfindung in einer bestimmten Ausführungsform ein Verfahren bereit, welches die Bestimmung der H-FABP-Konzentration in einem ersten Assay wie oben definiert umfasst, wodurch ein positives Ergebnis entweder ein CJD oder einen akuten Myokardinfarkt anzeigt, und welches ferner die Durchführung eines zweiten diagnostischen Assays für den akuten Myokardinfarkt (AMI) alleine umfasst, wodurch ein positives Ergebnis in dem H-FABP-Assay und ein negatives Ergebnis in dem AMI-Assay anzeigt, dass der Patient an einer CJD leiden könnte. Die Assays, welche Troponin-I und Kreatinkinase MB (CK-MB) als frühe biochemische Marker für den akuten Myokardinfarkt (AMI) verwenden sind gut bekannt und für den oben genannten Zweck geeignet.

[0011] Es wurde ein ähnliches H-FABP und auch ein hirnspezifisches Fettsäurebindungsprotein (B-FABP) in dem Hirn von Mäusen gefunden, siehe Pu, L. et al., *Molecular and Cellular Biochemistry* 198, 69–78 (1999). Von dem Hirn-H-FABP (nicht mit dem B-FABP zu verwechseln) nimmt man an, dass es sich von dem Herz-H-FABP durch eine einzige Aminosäuresubstitution unterscheidet. Das B-FABP ist jedoch deutlich unterschiedlich. Sellner, P.A. et al., „Development role of fatty acid binding Proteins in mouse brain" *Dev. Brain Res.* 89, 33–46 (1995) beurteilte die DNA-Homologie mit 69%, während A. Schreiber et al., „Recombinant human heart-type fatty acid binding Protein as standard in immunochemical assays", *Clin. Chem. Lab. Med.* 36(5), 283–288 (1998), 64% Aminosäuresequenzhomologie erwähnt und dass ein monoklonaler Antikörper gegen das humane H-FABP mit dem humanen B-FABP mit einem Ausmaß von nur 1,7% kreuzreagiert.

[0012] Da nun die vorliegenden Erfinder gefunden haben, dass das H-FABP ein Marker für eine CJD ist, ist es eine gut begründete Vorhersage, dass B-FABP auch einer sein wird. Da B-FABP spezifisch für das Hirngewebe ist und anscheinend nicht signifikant mit einem monoklonalen Antikörper gegen H-FABP reagiert, wird es keine Positiven für den AMI geben, was einen separaten Assay für den AMI überflüssig macht.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] Die Figur ist eine graphische Darstellung, wobei auf der y-Achse die H-FABP-Konzentration aufgetragen ist, repräsentiert durch die Messung der optischen Dichte bei 405 nm, wie durch das Verfahren der Erfindung bestimmt wurde, für (a) eine Kontrollgruppe, die weder eine CJD noch einen AMI hat, (b) eine Gruppe, die einen AMI hat und (c) eine Gruppe, die eine CJD hat.

BESCHREIBUNG DER BESTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0014] Für das Assayverfahren kann die Probe von irgendeiner geeigneten Körperflüssigkeit eines Subjekts genommen werden, vorzugsweise aber Plasma oder Serum (anstatt Gesamtblut). Die Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) ist eine weitere nützliche Flüssigkeit, insbesondere wenn Tiere wie Rinder getestet werden.

[0015] Das Verfahren kommt für alle Typen einer TSE, einschließlich jener, auf die oben Bezug genommen wird, und für irgendeinen Menschen oder irgendein Tier in Frage, der oder das daran leidet oder vermutet wird daran zu leiden. Insbesondere ist die Erfindung auf alle Typen der CJD im Menschen anwendbar, einschließlich neuer Variante, sporadische und genetische (familiäre) CJD. Ferner ist es auf BSE in Rindern und BSE-artigen Erkrankungen in anderen Tieren, z.B. Rotwild, anwendbar.

[0016] Der Marker, H-FABP oder B-FABP, wird vorzugsweise durch einen Immunoassay gemessen, wobei ein spezifischer Antikörper gegen H-FABP verwendet wird und das Ausmaß der Antigen (H-FABP oder B-FANP)/Antikörper-Interaktion gemessen wird. Für die Diagnose bei menschlichen Patienten ist der Antikörper vorzugsweise anti-human H-FABP oder B-FABP. Ebenso ist, wenn das Subjekt ein Tier ist, der Antikörper vorzugsweise anti- zu dem H-FABP oder B-FABP derselben Tierart, z.B. anti-bovin H-FABP oder B-FABP, wenn der Patient ein Rind ist. Es gibt jedoch einige Kreuzreaktivität von den Antikörpern zwischen den Spezies, was häufig die Verwendung eines heterologen Antikörpers ermöglicht: zum Beispiel anti-Ratte/Maus H-FABP kann verwendet werden, um BSE in Rindern nachzuweisen. Es kann ein monoklonale Antikörper (zweckdienlich ein Maus) oder ein technischer Antikörper sein. Vorzugsweise wird ein Maus anti-human, anti-bovin ect. monoklonaler Antikörper verwendet. Es sind Antikörper gegen H-FABP bekannt, z.B. 66E2 und 67D3, beschrieben von Roos, W. et al., „Monoclonal antibodies to human heart type fatty acid-binding Protein", *J. Immunol. Methods* 183 149–153 (1995). Der Antikörper 66E2 ist kommerziell erhältlich. Es kann auch die ge-

wöhnliche Köhler-Milstein-Methode verwendet werden, um H-FABP- oder B-FABP-Antikörper zu generieren. Die Proteinquelle für diesen Zweck kann das natürlich erlangte oder durch rekombinante DNA-Techniken hergestellte Protein sein. Rekombinantes humanes H-FABP und B-FABP sind von Schreiber, A. supra, beziehungsweise von Shimizu, F. et al., „Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid binding Protein (B-FABP)“, *Biochem Biophys. Acta* 1354, 24–28 (1997) beschrieben worden. Weniger vorzugsweise kann der Antikörper polyklonal sein.

[0017] Es kann irgendein bekanntes Immunoassayverfahren verwendet werden. Ein Sandwichassay wird bevorzugt. In diesem Verfahren wird ein erster Antikörper gegen das FABP an die feste Phase wie an ein Loch in einer Plastikmikrotiterplatte gebunden und mit der Probe und einem zweiten markierten Antikörper, der für das H-FABP oder B-FABP spezifisch ist, inkubiert. Alternativ könnte ein Antikörperfangassay hier verwendet werden, wobei der Probe ermöglicht wird an die feste Phase zu binden und der anti-FABP-Antikörper wird dann zugegeben und eine Bindung ermöglicht. Nach dem Abwaschen von ungebundenem Material wird die Anwesenheit oder Menge von Antikörper, gebunden an die feste Phase, bestimmt, wobei ein markierter zweiter Antikörper, der anti- zu dem ersten ist, verwendet.

[0018] In einer weiteren Ausführungsform könnte ein Wettbewerbsassay zwischen der Probe und einem markierten FABP oder einem davon abgeleiteten Peptid durchgeführt werden, wobei diese beiden Antigene in Konkurrenz um eine begrenzte Menge anti-FABP-Antikörper, der an einen festen Träger gebunden ist, stehen. Das markierte FABP oder Peptid könnte mit dem Antikörper an der festen Phase vorinkubiert werden, wodurch das FABP in der Probe einen Teil des FABP oder Peptids davon, gebunden an den Antikörper, verdrängt.

[0019] In einer weiteren Ausführungsform wird den zwei Antigenen ermöglicht in einer einzigen Coinkubation mit dem Antikörper zu konkurrieren. Nach dem Entfernen des ungebundenen Antigens von dem Träger durch Waschen, wird die Menge an Markierung, die an den Träger gebunden ist, bestimmt und die Mengen an Protein in der Probe mit Bezug auf Standardtitrationskurven, die vorher aufgestellt wurden, gemessen.

[0020] Die Markierung ist vorzugsweise ein Enzym. Das Substrat für das Enzym kann farbbildend, fluoreszent oder chemilumineszent sein.

[0021] Es ist besonders bevorzugt eine amplifizierte Assayform zu verwenden, wodurch ein verstärktes „Signal“ von einem relativ geringen Proteinlevel, welcher nachgewiesen werden soll, erzeugt wird. Eine bestimmte Form eines amplifizierten Immunoassays ist ein Assay mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL). Hier wird der Antikörper vorzugsweise mit der Meerrettichperoxidase markiert, welche an einer Chemilumineszenzreaktion mit Luminol, einem Peroxidasesubstrat und einer Verbindung teilhat, welche die Intensität und die Dauer der emittierten Lichts erhöht, typischerweise 4-Iodphenol und 4-Hydroxymzimtsäure.

[0022] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform für einen amplifizierten Immunoassay ist eine Immuno-PCR. Bei dieser Technik wird der Antikörper kovalent mit einem zufälligen DNA-Molekül verbunden, welches PCR-Primer umfasst, wodurch die DNA mit dem daran gebundenen Antikörper durch die Polymerasekettenreaktion amplifiziert wird. Siehe Hendrickson, E.R. et al., *Nucleic Acids Research* 23, 522–529 (1995) oder Sano, T. et al., in „Molecular Biology and Biotechnology“ Hrsg. Robert A. Meyers, VHC Publishers, Inc. (1995), Seiten 458–460. Das Signal wird wie zuvor ausgelesen.

[0023] In einem besonders bevorzugten Verfahren wurde ein enzymgekoppelter Immunosorbent Assay (ELISA) entwickelt, um H-FABP im Serum nachzuweisen. Da H-FABP auch ein Marker für den AMI ist, wurden die Level von Troponin-I oder CK-MB untersucht, um irgendeinen Herzschaden auszuschließen. Wie in dem Beispiel beschrieben ist wurden diese Assays in seriellen Plasma- und CSF-Proben beurteilt, welche von Patienten waren, die keinen AMI oder keine CJD haben, von Patienten mit einem AMI, von Patienten mit Demenz und von Patienten mit einer durch Autopsie bestätigten CJD. Die Sensitivität, Spezifität und vorhersagbare Genauigkeit war für das H-FABP bei der CJD über einem geeigneten Grenzlevel jeweils 100%. Folglich stellt der H-FABP-Nachweis kombiniert mit dem Assay für Troponin-I oder CK-MB einen nützlichen Serummarker für die CJD-Diagnose oder einen Hirnschaden bereit.

[0024] Die Verwendung von einem schnellen mikropartikelverstärktem turbidimetrischen Immunoassay, der für H-FABP im Fall von einem AMI entwickelt wurde, Roberts, M. et al., „Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for Plasma fatty acid-binding Protein, an early marker of acute myocardial infarction“, *Clin. Chem.* 44, 1264–1567 (1998), sollte die Zeit für den Assay drastisch verkürzen. Folglich sollte die volle Automatisierung in einem weit verbreitet verwendeten klinischen Chemieanalyser, wie das „COBAS“ MIRA Plus-System von Hoffmann-La Roche oder das „AxSYM“-System von Abbott Laboratories, mög-

lich sein und auf die routinemäßige klinische Diagnose von einer CJD angewendet werden.

[0025] Das H-FABP oder B-FABP kann durch andere Mittel als einen Immunoassay gemessen werden. Zum Beispiel kann die Probe einer 1- oder 2-DE Gelelektrophorese unterworfen werden und Menge an FABP durch densitometrischen Scannen des Gels oder des Blots davon abgeschätzt werden.

[0026] Der Assay der Erfindung kann zusammen mit einem oder mehreren anderen pre mortem Assays für die TSE verwendet werden, einschließlich besonders jeder oben beschriebenen Assays. Solche kombinierten Verfahren sind besonders bei der Diagnose von BSE in wiederkäuenden Tieren wie Rindern nützlich.

[0027] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

BEISPIEL 1

Materialien und Methoden

Patienten

[0028] Die Untersuchungspopulation bestand aus 3 dem Alter und Geschlecht nach angepassten Kontrollpatienten (Kontrollgruppe), 3 bestätigten AMI-Patienten (AMI-Gruppe), 3 bestätigten Demenzpatienten (Demenzgruppe) und 3 bestätigten CJD-Patienten (CJD-Gruppe). Die Kontrollgruppe umfasste 2 Männer, mittleres Alter 66 Jahre im Bereich von 46–86 Jahren, und 1 Frau mit einem Alter von 63 Jahren. Die AMI-Gruppe umfasste 2 Männer, mittleres Alter 65 Jahre im Bereich von 40–90 Jahren, und 1 Frau mit einem Alter von 72 Jahren. Die Demenzgruppe umfasste 2 Männer, mittleres Alter 65 Jahre im Bereich von 43–87 Jahren, und 1 Frau mit einem Alter von 64 Jahren. Die CJD-Gruppe umfasste 2 Männer, mittleres Alter 68 Jahre im Bereich von 62–74 Jahren, und 1 Frau mit einem Alter von 65 Jahren. Es wurden Blut- und CSF-Proben von jedem der Patienten der CJD-Gruppe entnommen. Die Blutproben wurden in trockenen heparinhaltigen Röhrchen gesammelt. Nach der Zentrifugation bei 1500 g für 15 min bei 4°C wurden die Röhrchen bei –20°C bis zur Analyse aufbewahrt. Die Patienten der CJD-Gruppe durchliefen serienmäßige klinische Beurteilungen durch Neurologen, um die CJD-Diagnose zu bestätigen. Die Patienten aus der AMI-Gruppe wurden mit einem bestätigten AMI in das Krankenhaus eingewiesen (Troponin-I-Konzentration > 2 ng/ml). Eine klinische Beurteilung wurde an allen Patienten der Kontrollgruppe durchgeführt, um eine CJD oder einen AMI auszuschließen.

Messung der Hirn- und Herz-H-FABP

[0029] Die H-FABP-Level im Plasma wurden durch einen Sandwich-ELISA gemessen. Es wurde eine 96-Loch Polystyrol Mikroplatte (NUNC) mit 100 Mikrolitern/Loch Ziege anti-human FABP, welcher alle Isoformen nachweist (Spectral Diagnosis HC, Ontario, USA), mit 20 Mikrogramm/ml in einem Carbonatpuffer 0,1 M pH 9,6 über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platte wurde automatisch mit PBS (15 mM Na₂PO₄–120 mM NaCl–2,7 mM KCl pH 7,4, Sigma) auf einem BioRad NOVAPATH™-Wäscher gewaschen. Jeder Waschschrift wurde mit frischem PBS durchgeführt. Nicht spezifische Bindungsstellen wurden mit 200 Mikrolitern/Loch 2% Kasein in Carbonatpuffer für 2 h bei 37°C blockiert. Nach dem Waschschrift wurden die Proben in Duplikaten mit 100 Mikrolitern/Loch pipettiert. Die Platte wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschschrift wurden 100 Mikroliter/Loch Maus anti-human Herz-FABP (Klon 66E2, HyCult Biotechnology BV, Uden, Netherlands), 0,3 Mikrogramm/ml in PBS-1% BSA, für 1 h bei Raumtemperatur (R.T.) unter Schütteln inkubiert. Nach dem Waschschrift wurden 100 Mikroliter/Loch mit alkalischer Phosphatase markiertes anti-Maus Immunglobulin (Dako, Dänemark), 1,5 mg/ml in PBS, für 1 h 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach dem Waschschrift wurden 50 Mikroliter/Loch Substrat für die alkalische Phosphatase zugegeben, das heißt 1,5 mg/ml para-Nitrophenylphosphat in Diethanolamin, und dann die Proben für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 Mikrolitern/Loch 1 M NaOH angehalten. Die Farbentwicklung wurde mit einem Mikrotiterplattenleser bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

[0030] Die „Leer“-Assays in Puffer wurden auch durchgeführt.

Messung von CK-MB und Troponin-I

[0031] Ein AMI wurde durch eine klinische Beurteilung und die Messung von Troponin-I und CK-MB diagnostiziert. Die Proben wurden bei 1500 g für 15 min zentrifugiert und bei –20°C aufbewahrt. Die Serumlevel von CK-MB und Troponin-I wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikropartikel-Enzymimmunoassays (MEIA) mit einem automatisierten chemischen Analysegerät „AxSYM“-System (Abbott Laboratories, Abbott

Park, IL, USA) bestimmt. Die Bildungsrate der Fluoreszenzprodukte war direkt proportional zu der Menge an Troponin-I in der Probe. Die Nachweisgrenze für Troponin-I war 0,3 Mikrogramm/l. Die CK-MB-Messung ist proportional zu der Menge an Fluoreszenzsonden und die Nachweisgrenze war 0,7 Mikrogramm/l.

Statistische Analyse

[0032] Die H-FABP-Werte wurden in den Werten der optischen Densitometrie (OD) als entweder mittlere plus oder minus SD oder als Median und Interquartilbereich ausgedrückt. Die Level von Troponin-I und CK-MB wurden in Konzentrationseinheiten (ng/ml) ausgedrückt. Es wurden der nicht parametrische Mann-Whitney U-Test und Kruskal-Wallis H-Test verwendet, um die Konzentrationen von H-FABP, Troponin-I und CK-MB in dem Plasma zwischen den Gruppen zu vergleichen. Es wurde die „PRISM“-Software verwendet, um Box/Whisker- und Streudiagramme auszuarbeiten. Das 95% Konfidenzintervall (CI) und die Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven, definiert durch die „Analyse-it“-Software von Microsoft „EXCEL“, wurden verwendet, um den Diskriminierungszeitpunkt der Indikatoren zu berechnen. Siehe Murphy, J.M. et al., „Performance of screening and diagnostic tests“, Arch. Gen. Psychiatry 44, 550–555 (1987). Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

Ergebnisse

Klinische Merkmale

[0033] Den Patienten aus der CJD-Gruppe wurde eine vollständige klinische Beurteilung erteilt. Eine CJD wurde letztendlich mit Hilfe einer Hirnhistologie nach der Autopsie diagnostiziert. Die Patienten aus der Kontrollgruppe wurden in das Krankenhaus eingewiesen und eine CJD und ein AMI wurden durch eine klinische Beurteilung ausgeschlossen.

[0034] Die Patienten aus der AMI-Gruppe wurden in das Krankenhaus mit einem bestätigten AMI mit hohen Troponin-I-Leveln (> 2 ng/ml) eingewiesen.

[0035] Die Assayergebnisse sind unten in der Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Assaytyp	Kontrollgruppe Plasma	AMI-Gruppe Plasma	Demenzgruppe CSF	CJD-Gruppe Plasma	CJD-Gruppe CSF
H-FABP median (25–75%) OD, 405 nm	0,25 (0,23–0,27)	2,89 (2,70–3,0)	0,20 (0,16–0,31)	0,79 (0,74–0,86)	0,46 (0,38–0,54)
Troponin-I median (25–75%) IU ng/ml	0 (0,0–0,0)	50 (50–359)	0 (0,0–0,2)	0 (0,0–0,2)	0 (0,0–0,2)

[0036] Die Plasmalevel von H-FABP (OD-Messung) in der AMI-Gruppe waren signifikant höher als die entsprechenden Level in der Kontrollgruppe (Tabelle 2). Die AMI-Gruppe hatte einen medianen H-FABP-Level (Bereich 25–75%) von 2,89 (2,70–3,0), während die Kontrollgruppe einen Level von 0,25 (0,23–0,27) hatte. Der Plasmalevel von H-FABP in der CJD-Gruppe war zwischen den Anstiegen der AMI- und der Kontrollgruppe. Der mediane H-FABP-Level (Bereich 25–75%) in dem Plasma der CJD-Gruppe war 0,79 (0,74–0,86). Die Sensitivität, Spezifität und vorhersagbare Genauigkeit der H-FABP-Level jenseits des Grenzwerts von 0,30 waren 100%, 100% beziehungsweise 100%. Um die Unterschiede in den H-FABP-Konzentrationen zwischen der AMI und den Kontrollgruppen zu bestätigen wurde Troponin-I untersucht. Zusätzlich, um einen AMI und eine CJD auszuschließen, wurde es auch bei den CJD-Proben untersucht. Die Konzentration von Troponin-I wurde in jeder Gruppe gemessen. Die Konzentration von Troponin-I in der AMI-Gruppe war signifikant ($p > 0,01$) höher als in der Kontrollgruppe.

Diskussion

[0037] Die oben genannten Ergebnisse zeigen an, dass H-FABP ein potenzieller Marker für die CJD-Diagno-

se ist. Da H-FABP ein paar Jahre zuvor als ein Marker für den akuten Myokardinfarkt vorgestellt wurde, mussten eine CJD und ein AMI durch einen weiteren biochemischen AMI-Marker wie Troponin-I oder CK-MB ausgeschlossen werden. Nach der Abgrenzung eines AMI für die CJD-Patienten konnte die Serum- sowie die CSF-Konzentration von H-FABP als ein spezifischer Marker für eine CJD verwendet werden.

[0038] In der vorliegenden Untersuchung ermöglichte der H-FABP-Assay eine Sensitivität, Spezifität und eine vorhersagbare Genauigkeit (OD-Reaktion $> 0,30$) von 100%. Diese Werte waren signifikant höher als jene, die in einem anderen pre mortem Nachweis für die CJD erhalten wurden, welches von dem Protein 14-3-3 Gebrauch macht, einem dimeren phosphoserinbindenden Protein. Dieses Verfahren beinhaltet einen Immunoblot mit einem anti-14-3-3 Antikörperprotein. Die drei Demenzpatienten waren in dem anti-14-3-3 Immunoblot positiv. Die Spezifität von 14-3-3 ist nicht auf die CJD beschränkt, sondern schließt auch Alzheimerdemenz, zerebrale Komplikationen von Kopfverletzungen und einige andere Demenzformen ein.

[0039] Der akute Myokardinfarkt wird mit Hilfe von biochemischen Markerassays wie Assays für Herz-Troponin-I, Kreatinkinase MB, Myoglobin und unlängst für H-FABP dignostiziert. Der H-FABP-Level für die CJD könnte mit dem AMI interferieren und eine Abgrenzung zwischen einem AMI und einer CJD wurde durch die Verwendung eines anderen AMI-Markers gemacht.

BEISPIEL 2

[0040] Die Plasma- und CSF-Proben wurden aus humanen Patienten entnommen. Die Erkrankung, an welcher die Patienten litten, war in einigen Fällen eindeutig eine CJD, entweder sporadische (sp) oder neue Variante (v), wie durch Autopsie bestimmt wurde. In anderen Fällen („nicht CJD ?“) wurde diagnostiziert, dass der Patient keine CJD hatte, aber nachdem einige dieser Patienten noch am Leben sind, ist dies nicht notwendigerweise durch eine Autopsie bestätigt worden. Die Proben wurden auf eine CJD durch das anti-14-3-3-Verfahren aus dem Stand der Technik und durch die vorliegende Erfindung untersucht.

[0041] Der 14-3-3 Immunoblot wurde durchgeführt, indem die Proben auf einem 12% SDS-PAGE-Gel in tris-SDS-Glyzinpuffer laufen gelassen wurden. Die Proteine wurde danach mittels einem halbtrockenen Elektroblot bei konstanten 200 mA für 3 Stunden in CAPS-Puffer auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde blockiert, mit einem polyklonalen anti-14-3-3 Kaninchen IgG-Antikörper von Santa Cruz, Inc. (Cat sc 629, Lot L117) inkubiert, mit Puffer gewaschen und mit dem zweiten Antikörper, einem Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin, markiert mit der Meerrettichperoxidase (Dako, Dänemark) inkubiert. Die Membran wurde dann wieder gewaschen. Das Waschen nach jeder Inkubation wurde in PBS-Puffer, pH 7,2 mit 5% „Twen“ dreimal kurz und fünfmal jeweils für fünf Minuten durchgeführt. Die Peroxidase wurde dann durch ein Standardverfahren für verstärkte Chemilumineszenz unter Verwendung eines Kits von Boehringer Mannheim, „BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)“ untersucht. Die beobachtete Lumineszenz bedeutete ein positives Ergebnis in dem Immunoblot.

[0042] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung war wie in Beispiel 1 beschrieben, mit der Ausnahme, dass der angelegte Sensitivitätsgrenzwert (unter Verwendung der ROC-Kurven) bei einer OD $> 0,2$ für die Plasma-proben und bei einer OD $> 0,1$ für die CSF-Proben war. Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse.

[0043] Mit Bezug auf die Tabelle 2 wurde der anti-14-3-3-Test zweimal von verschiedenen Arbeitskräften in dem Labor der Erfinders durchgeführt, welche dieselben Ergebnisse erbrachten. Die Korrelation zwischen den anti-14-3-3 und den anti-H-FABP Ergebnissen war annähernd 100%, die Ausnahme war die Probe CSP-10, wo das Ergebnis nicht eindeutig war. Die Plasmaproben ergaben mit dem anti-H-FABP in vier Fällen Positive, in welchen der anti-14-3-3-Test Negative ergab. Die könnte heißen, dass der anti-14-3-3-Test in allen Fällen kein wahres Ergebnis ergibt.

Tabelle 2

Probenbezeichnung	Krankheitszuordnung	Anti-14-3-3 Immunoblot (Stand der Technik)*	Anti-H-FABP ELISA (diese Untersuchung)
PLAS2	vCJD	negativ	positiv
PLAS3	vCJD	negativ	negativ
PLAS4	vCJD	negativ	positiv
PLAS5	spCJD	positiv	positiv
PLAS6	spCJD	negativ	negativ
PLAS7	spCJD	positiv	positiv
PLAS9	nicht CJD ?	positiv	positiv
PLAS10	nicht CJD ?	positiv	positiv
PLAS11	nicht CJD ?	negativ	positiv
PLAS12	nicht CJD ?	negativ	positiv
CSF1	spCJD	positiv	positiv
CSF2	spCJD	positiv	positiv
CSF3	spCJD	positiv	positiv
CSF4	spCJD	positiv	positiv
CSF5	spCJD	positiv	positiv
CSF10	vCJD	positiv	positiv
CSF11	vCJD	positiv	nicht eindeutig
CSF12	vCJD	positiv	positiv
CSF6	nicht CJD ?	negativ	negativ
CSF7	nicht CJD ?	positiv	positiv
CSF8	nicht CJD ?	negativ	negativ
CSF9	nicht CJD ?	negativ	negativ
CSF13	nicht CJD ?	negativ	negativ
CSF14	nicht CJD ?	negativ	negativ

* zweimal von verschiedenen Arbeitskräften mit denselben Ergebnissen durchgeführt.

BEISPIEL 3

[0044] Das Verfahren der Erfindung wurde an gepoolten, konzentrierten CSF-Proben von 4 Rindern, für die BSE diagnostiziert wurde, und an gepoolten, konzentrierten Proben von 3 gesunden Rindern als Kontrollen durchgeführt. (Die Proben wurden mit „Microcon“ von Amicon konzentriert, um das Signal zum Hintergrundverhältnis zu verstärken).

[0045] Es wurde ein Ratte/Maus H-FABP ELISA-Kit von Hycult Biotechnology B.V., Uden, Niederlande, entsprechend den Angaben des Hersteller verwendet, wobei der Assay im Prinzip zu dem in Beispiel 1 beschriebenen Sandwich ELISA ähnlich ist. Der erste Antikörper, der an die Löcher gebunden ist, war jedoch anti-Ratte/Maus H-FABP anstatt anti-human H-FABP und der zweite Antikörper war ein peroxidasemarkierter anti-Ratte/Maus-Antikörper. (Diese Antikörper scheinen sowohl anti-Ratte als auch anti-Maus zu sein. Es sollte erklärt werden, dass dieser Kit nicht beabsichtigt war bovines H-FABP nachzuweisen. Es wurde unerwartet in der vorliegenden Erfindung gefunden, dass der anti-Ratte/Maus H-FABP-Antikörper bovines H-FABP erkennt). Der Assay ist kolorimetrisch, wobei ein SMP-Substrat und eine Auslesung bei 450 nm verwendet werden.

[0046] Die Ergebnisse, die in Tabelle 3 gezeigt sind, sind der Durchschnitt von Dublikatassays und zeigen deutlich den beobachteten Unterschied in den BSE-betroffenen Rindern verglichen mit den gesunden Rindern an.

Tabelle 3

PROBE	durchschnittliche Intensität	Variationskoeffizient
Leer (PBS)	0,172	3,6%
gesunde CSF	0,178	11,8%
gesunde CSF	0,189	2,4%
BSE CSF	0,304	1,5%
BSE CSF	0,576	4,0%
BSE CSF	0,465	10,8%
bovines Herz (10 mg/ml)	2,872	2,0%
Leer (PBS)	0,178	2,1%

[0047] Jede der oben genannten Publikationen ist hierin durch die Referenz in dem Ausmaß enthalten, zu welchem man sich hierin darauf beruft.

Patentansprüche

1. Verfahren für einen diagnostischen Assay für eine übertragbare spongiöse Enzephalopathie (TSE) oder die Möglichkeit einer solchen in einer verdächtigen Körperflüssigkeitsprobe, welcher die Bestimmung der Konzentration des Herztyp oder Gehirntyp Fettsäurebindungsproteins (H-FABP oder B-FABP) in der Probe umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Gegenstand ein humaner Patient ist und die Konzentration des H-FABP in einem ersten Assay bestimmt wird, wodurch ein positives Ergebnis entweder eine CJD oder einen akuten Myokardinfarkt anzeigt, und welches ferner die Durchführung eines zweiten diagnostischen Assays für den akuten Myokardinfarkt (AMI) alleine umfasst, wodurch ein positives Ergebnis in dem H-FABP-Assay und ein negatives Ergebnis in dem AMI-Assay anzeigt, dass der Patient an einer CJD leidet oder an einer CJD leidet könnte.

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin der AMI-Assay die Bestimmung der Konzentration von Troponin-1 oder der Kreatinkinase-MB im Plasma umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, worin ein Antikörper gegen H-FABP in dem H-FABP-Assay verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin die Körperflüssigkeitsprobe von einem humanen Patienten ist und ein monoklonaler Maus-anti-human FABP-Antikörper verwendet wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, worin der Assay für das H-FABP einen Sandwich-ELISA umfasst.

7. Verfahren nach Anspruch 1, worin das B-FABP oder ein Antikörper dagegen ohne irgendeinen AMI-Assay in Kombination damit verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergegangenen Ansprüche, worin der H-FABP- oder B-FABP-Assay an einer Blutplasma- oder Serumprobe durchgeführt wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

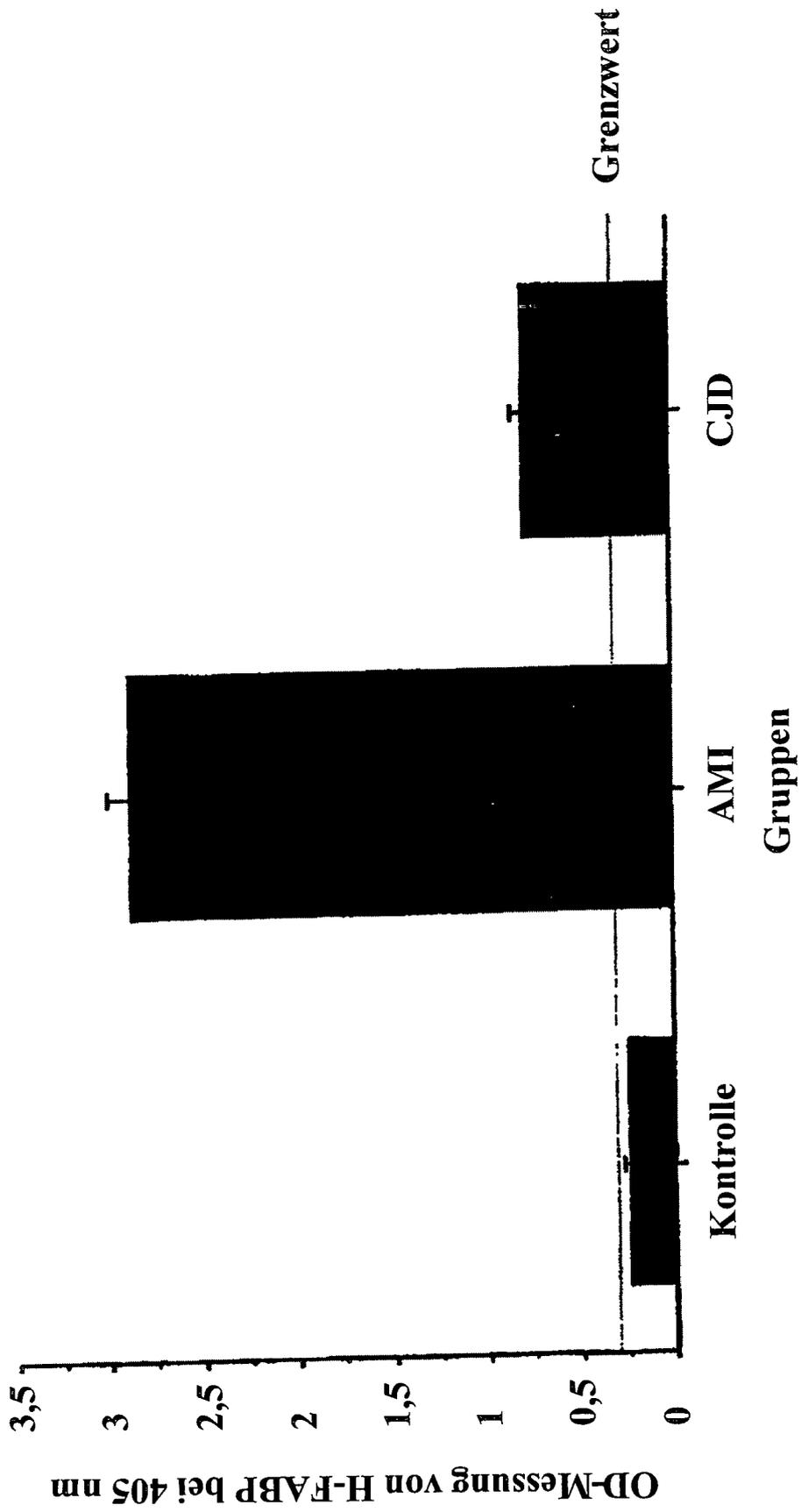


Fig. 1