

(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
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/097440 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68, 33/58, H01J 49/00, G01N 33/49
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01966
- (22) Internationales Anmeldedatum:
28. Mai 2002 (28.05.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 26 695.2 29. Mai 2001 (29.05.2001) DE
101 26 696.0 29. Mai 2001 (29.05.2001) DE
101 26 697.9 29. Mai 2001 (29.05.2001) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: KIEHL, Reinhold [DE/DE]; Saliterweg 1,
93437 Furth im Wald (DE).
- (74) Anwalt: LINDNER, Manfred, K.; Gottfried-Böhm-Ring
25, 81369 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, GQ, 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 DETERMINING PEPTIDES OR PROTEINS, MASS SPECTROMETRY FOR METALS AND DETERMINATION OF CONDUCTIVITY CAPACITY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON PEPTIDEN/PROTEINEN, MASSENSPEKTROMETRIE FÜR METALLE UND LEITFÄHIGKEITSFESTSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining peptides or proteins. Said method is characterised in that peptides or proteins are measured at their C-end, N-end and/or their modified parts, in addition to in their entirety using specific antibodies, which are labelled in such a way that subsequent measurement is possible. The invention also relates to a mass spectrometry method and device, in which a carrier gas source, in particular a CO source is provided, in order to bombard a sample with a carrier gas, in particular CO, or in which an enzyme-solution container is provided with/for an enzyme solution for reaction with at least one metal. The invention also relates to a method and device for the measurement of conductivity capacity, in which a blood sample is introduced into a measuring tube, which is surrounded by a number of electrodes, said electrodes being controlled crosswise according to a predetermined pattern by means of a frequency generator.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass Peptide/Proteine an deren C-Ende, N-Ende und/oder deren modifizierten Stellen sowie in ihrer Gesamtheit mit spezifischen Antikörpern vermessen werden, die derart markiert sind, dass eine spätere Vermessung möglich ist. Weiterhin betrifft die Erfindung vorrichtungs- und verfahrensmässig Massenspektrometrie, wobei eine Trägergasquelle, insbesondere eine CO-Quelle, vorgesehen ist, um eine Probe mit Trägergas, entsprechend insbesondere CO, zu beschleunigen, oder wobei ein Enzym-lösungsbehälter mit/für eine(r) Enzym-lösung zur Reaktion mit wenigstens einem Metall vorgesehen ist. Die Erfindung betrifft vorrichtungs- und verfahrensmässig auch eine Leitfähigkeitsmessung, wobei eine Blutprobe in einem Messtubus eingeführt wird, der von einer Vielzahl von Elektroden umgeben ist, und wobei die Elektroden nach einem vorgegebenen Schema kreuzweise mit einem Frequenzgenerator angesteuert werden.



WO 02/097440 A2

Verfahren zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen, Massenspektrometrie für Metalle und Leitfähigkeitsfeststellung

Beschreibung

Die Erfindung befaßt sich allgemein mit der Bestimmung von Peptiden/Proteinen. Insbesondere in diesem Zusammenhang, aber auch allgemein, befaßt sich die Erfindung auch mit Massenspektrometrie für Metalle und Leitfähigkeitsfeststellern. Soweit in den vorliegenden Unterlagen und im Rahmen der Erfindung Massenspektrometrie für Metalle und Leitfähigkeitsfeststeller offenbart sind, handelt es sich dabei zusätzlich auch um jeweils eigenständige Erfindungen mit unter Umständen unabhängigen Schutzbedürfnissen und Schutzmöglichkeiten.

Insbesondere betrifft die Erfindung gemäß einem Aspekt die Messung von bestimmten Peptiden/Proteinen, die als Nachweis für Allergien dienen können. Speziell geht es gemäß diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung um die Vermessung von Gamma-Interferon. Zu klären ist dabei, wieviel aktives Gamma-Interferon sich noch im Blut befindet, um die von außen zuzugebende Menge von Gamma-Interferon für einen Patienten bestimmen zu können.

Bekannt ist die Vermessung von undifferenziertem (aktiven plus inaktiven abgebauten) γ IFN (Peptiden, Proteinen) in Zellkulturen, Zelllinien aus Sekretionsassays mit stimulierten isolierten Zellen. Bekannt ist auch, daß die für Patienten/Personen (Spezies) relevanten aktiven γ IFN (Peptide, Proteine) -Moleküle in deren Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blut, sehr schnell verstoffwechselt werden, abgebaut werden und somit eine genaue Zuordnung der relevanten aktiven γ IFN (Peptid, Protein) Mengen mit den herkömmlichen Assays nicht möglich ist.

Gemäß dem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung hat diese zum Ziel, die vorstehenden Nachteile zu beseitigen. Insbesondere strebt die Erfindung insoweit an, eine genaue Zuordnung der relevanten aktiven γ IFN (Peptid, Protein) Mengen zu ermöglichen.

Dies wird mit einem Verfahren gemäß dem Anspruch 1 erreicht.

Erfindungsgemäß wird somit geschaffen, ein Verfahren zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass Peptide/Proteine an deren C-Ende, N-Ende und/oder deren

modifizierten Stellen sowie in ihrer Gesamtheit mit spezifischen Antikörpern vermessen werden, die derart markiert sind, dass eine spätere Vermessung möglich ist.

Die grundsätzliche Idee der Erfindung basiert auf der Vermessung von Peptiden/Proteinen an deren C-Ende, N-Ende, deren modifizierten Stellen, und in ihrer Gesamtheit (Vergleich mit gängigen γ IFN-Assays) mit spezifischen Antikörpern, die derart markiert sind, daß eine spätere Vermessung möglich ist.

Die Erfindung führt zu neuen Verfahren zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen, zum Nachweis von aktivem γ IFN (Interleukinen, Cytokinen) und dessen Abbauprodukten/Metaboliten im Blut, in Plasma, in Serum-(Körper)flüssigkeiten, in Geweben, sowie zur Abtrennung von aktivem γ IFN (Interleukinen, Cytokinen) und dessen Abbauprodukten/Metaboliten aus diesen Medien. Mit den Ergebnissen dieser Verfahren können in vorteilhafter Weise Therapien von Krankheitsbildern/Stoffwechselerkrankungen (Urtikaria, Allergien, Leukämien, Thrombosen, Artherosklerosen, Rheuma, Rheumatoide Arthritis, u.a.m.) sowie Therapien von Krankheitsbildern/Stoffwechselerkrankungen, die mit der Anwesenheit von aktivem γ IFN (Interleukinen, Cytokinen) und dessen Abbauprodukten/Metaboliten verbunden sind, entwickelt, ausgewählt, erleichtert oder verbessert werden.

Weiterhin ermöglicht die vorliegende Erfindung eine Bestimmung von Peptiden/Proteinen, zum Ersatz von aktivem γ IFN (Interleukinen, Cytokinen) und dessen Abbauprodukten/Metaboliten bei fehlender Menge zum Normalwert. Auch insofern liefert die vorliegende Erfindung positive Beiträge für die Entwicklung, Auswahl, Erleichterung und Verbesserung von Therapien von Krankheitsbildern/Stoffwechselerkrankungen, die mit dem Fehlen von aktivem γ IFN (Interleukinen, Cytokinen) und dessen Abbauprodukten/Metaboliten verbunden sind, und gleichzeitige (verhältnismäßige) Nachweise der verschiedenen γ IFN/Interleukine, Cytokine (Peptide/Proteine) zueinander sowie Rückschluß auf die Wirkung dieses speziellen Moleküls am Stoffwechselgeschehen sowie an der Auslösung oder Therapie von Entgleisungen.

Die Erfindung liefert ferner Beiträge zur Erklärung der Wirkung von γ IFN (II-4, II's, Cytokinen)-Peptiden/Proteinen auf die Therapie verschiedener Antitumor Drugs/Antagonisten-Agonisten (Cyt P 450 System u.a.) zur Erklärung der Änderung des Redoxpotentials u.a.m.

Gemäß einer bevorzugten und vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist bei dem Verfahren ferner vorgesehen, dass an den Antikörpern eine Nachweismöglichkeit (defection device) angekoppelt wird, die es erlaubt, über deren Konzentration die Menge der Antikörpermolekü-

le und damit die der unbekanntem zu bestimmenden Molekülmenge qualitativ und/oder quantitativ zu bestimmen.

Eine andere bevorzugte Ausgestaltung der Erfindung, wie vorstehend erläutert, sieht vor, dass die Nachweismöglichkeit oder Defection Device ausgelegt ist, die zu messende Konzentration so zu vervielfältigen oder amplifizieren. Die kann dadurch weitergebildet werden, dass entweder die Nachweismöglichkeit oder Defection Device selbst sehr groß ausgelegt wird und insbesondere in kleinere vorzugsweise gleiche Teile so zerlegt werden kann, dass deren Konzentration als bekannt vorausgesetzt und/oder leicht gemessen werden kann, oder dass die Nachweismöglichkeit oder Defection Device selbst so vervielfältigt oder amplifiziert werden kann, dass eine Vermessung leicht mit bekannten Methoden möglich ist.

Im Rahmen eines weiteren Aspektes der vorliegenden Erfindung betrifft diese auch Massenspektrometrie für Metalle oder allgemein Metallbestimmung, und zwar im Form eines Massenspektrometers und eines Verfahrens zur Metallbestimmung mit einem Massenspektrometer.

Ausgangspunkt für diesen Aspekt der Erfindung ist die herkömmliche Massenspektrometrie, bei der eine organische Probe in der Kammer des Massenspektrometers mit Elektronen oder einem LASER beschossen wird. Die dadurch entstehenden positiv geladenen Kationen werden über ein Magnetfeld nach Masse und Ladung getrennt und mit einem Detektor aufgenommen. Diese herkömmliche Massenspektrometrie ist auf leicht flüchtige Substanzen angewiesen.

Das Problem dieses herkömmlichen Massenspektrometers besteht deshalb darin, daß Metalle oder Metallsalze mit dieser Methode bisher nicht untersucht werden können. Entsprechend dem diesbezüglichen Aspekt der vorliegenden Erfindung ist es deren Ziel, Massenspektrometrie auch für Metalle oder Metallsalze zu ermöglichen.

Dazu schafft die vorliegende Erfindung ein Massenspektrometer, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Trägergasquelle, insbesondere eine CO-Quelle, vorgesehen ist, um eine Probe mit Trägergas, entsprechend insbesondere CO, zu beschließen, oder dass ein Enzymlösungsbehälter mit/für eine Enzymlösung zur Reaktion mit wenigstens einem Metall vorgesehen ist.

Das erfindungsgemäße Ziel wird somit dadurch erreicht, dass die beispielsweise herkömmlich übliche Elektronenquelle durch eine CO-Quelle oder allgemein Trägergasquelle ersetzt wird, wobei insbesondere metallhaltige Fluide in eine Probenkammer eingebracht werden. Die Trä-

gergasquelle oder insbesondere CO-Quelle bewirkt, daß die in den Fluiden enthaltenen Metalle in Karbonyl verflüchtigt und damit vom Detektor aufgenommen werden können.

Weiterhin schafft die Erfindung im Rahmen dieses Aspektes ein Metallbestimmungsverfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Probe mit Trägergas, insbesondere CO, von einer Trägergasquelle, entsprechend insbesondere einer CO-Quelle, beschossen wird, oder dass eine Enzymlösung mit wenigstens einem Probenmetall reagiert.

Vorzugsweise werden im Rahmen dieses Verfahrens metallhaltige Fluide in eine Probenkammer eingebracht. Die Trägergas- oder insbesondere CO-Bestrahlung oder der Trägergas- oder insbesondere CO-Beschuss bewirkt, daß die in den Fluiden enthaltenen Metalle in Karbonyl verflüchtigt und damit vom Detektor aufgenommen werden können.

Gemessen werden sollen vor allem anorganische Kationen, Pt (2+), Pd (2+), Ni (2+), inkl. Diese Metalle können in niedriger Konzentration mit den zur Zeit gängigen Methoden (AAS, usw.) nicht oder nur unzureichend vermessen werden. Interessant ist die Vermessung dieser Metalle vor allem im Hinblick auf verschiedene Umwelterkrankungen, wie Kontaktdermatitis, Asthma oder BSE, sowie das Ozonloch und den Treibhauseffekt.

Diese Metalle weisen normalerweise einen kleinen Dampfdruck auf. Es wird die Tendenz dieser Metalle zur Bildung flüchtiger Carbonyl ausgenutzt, womit diese Metalle im Massenspektrometer detektierbar werden. Autoabgase können damit dann ebenfalls direkt vermessen werden, womit die Vorrichtung und Methode für technische Überprüfungen von Kraftfahrzeugen, wie in Deutschland den TÜV, geeignet sind, ebenso atmosphärische Metalle und Verbindungen (Komplexe) sowie auch Organika u.a. mehr.

Insbesondere sind das erfindungsgemäße Massenspektrometer und Massenbestimmungsverfahren dafür ausgelegt, die Konzentration der Metalle durch die Bestimmung von enthaltenen und/oder entstehenden Peptide, Aminosäuren, etc., zu ermitteln. Vorzugsweise, jedoch nicht beschränkt darauf erfolgt dies mittels z.B. PCR-Reaktion oder den Methoden, die vorstehend gemäß dem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung beschrieben sind.

Bei einer anderen Variante der Erfindung im Zusammenhang mit der Massenspektrometrie können die Metalle auch mittels enzymatischer Reaktion bestimmt werden. Dazu werden diese Metalle in entsprechende Enzymlösungen eingetragen, welche spezifisch mit diesen Metallen reagieren, d.h. aktiviert werden (z.B. Nickel aktivierte Horse radish Peroxidase, Me-Proteasen, Superoxiddismutase, Glutathione-Peroxidase, usw.).

Im Rahmen noch eines weiteren Aspektes der vorliegenden Erfindung betrifft diese auch Leitfähigkeitsmessung und Leitfähigkeitsfeststeller.

Bekannt ist ein Biosensor mit zwei Elektroden, an denen eine konstante Spannung anliegt. Auf die Elektroden werden beispielsweise Blutzellen gegeben, wobei die Widerstandsänderung bei Zugabe der Zellen auf die Elektroden gemessen wird. Zusätzlich kann auch die Zellaktivität gemessen werden, wenn die Blutzellen sich bereits auf den Elektroden befinden und zusätzliche Stoffe zugegeben werden. Mit dieser Methode kann allerdings keine Messung von noch lebenden Zellen durchgeführt werden. Hierbei muß beachtet werden, daß Zellen nach Blutentnahme noch ca. eine halbe Stunde unter In-vivo-Bedingungen meßbar sind. Der dritte Aspekt der vorliegenden Erfindung hat und erreicht das Ziel, bei diesem Nachteil Abhilfe zu schaffen.

Eine erfindungsgemäße Leitfähigkeitsmessung ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Blutprobe in einen Meßtubus eingeführt wird, der von einer Vielzahl von Elektroden umgeben ist, und dass die Elektroden nach einem vorgegebenen Schema kreuzweise mit einem Frequenzgenerator angesteuert werden. Bei einem Leitfähigkeitsfeststeller nach der Erfindung ist vorgesehen, dass für die Einführung einer Blutprobe ein Meßtubus vorgesehen, der von einer Vielzahl von Elektroden umgeben ist, die nach einem vorgebbaren Schema kreuzweise mit einem Frequenzgenerator ansteuerbar sind.

Die Erfindung im Rahmen des hier behandelten Aspektes somit besteht darin, die Blutprobe in einen Meßtubus einzuführen, der von einer Vielzahl von Elektroden umgeben ist. Die Elektroden werden nach einem bestimmten Schema kreuzweise mit einem Frequenzgenerator angesteuert. Mit dieser Methode ist es beispielsweise möglich, bestimmte Redox-Zustände zu messen, insgesamt ist es möglich, die individuelle Reaktion des Patienten auf bestimmte Zugabestoffe zu messen.

Weitere vorzugsweise und/oder vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen und deren Kombinationen sowie insbesondere auch aus den gesamten vorliegenden Unterlagen, in denen weitere kombiniert oder alleine schutzfähige und schutzwürdige Ausgestaltungen offenbart sind.

Anhand der nachfolgend beschriebenen und in den Zeichnungen dargestellten Ausführungs- und Anwendungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert. In der Zeichnung zeigen:

- Fig. 1 ein Molekül mit Modifikationsstellen am Beispiel von γ IFN im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 2 ein Molekül, dem der N-terminus fehlt, am Beispiel von γ IFN im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 3 ein Ausführungsbeispiel eines Proteins, Peptids oder γ IFN mit Antikörper mit einer Defection Device als Nachweismittel, im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 4 ein weiteres Ausführungsbeispiel eines γ IFN mit Antikörper mit einer Defection Device als Nachweismittel in Verbindung mit einem Biochip, im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 5 eine diagrammartige Darstellung der Abtrennung der Defection Device als Nachweismittel, im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 6 ein Ausführungsbeispiel eines Umwandlungsschrittes im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 7 ein Ausführungsbeispiel eines Nachweisschrittes im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 8 ein Ausführungsbeispiel eines Berechnungsschrittes im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 8a eine Ausführungsvariante gemäß Fig. 8, jedoch speziell für ein fehlendes N-Ende,
- Fig. 9 ein Ausführungsbeispiel eines Auswertungsschrittes im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 10 zwei weitere Ausführungsbeispiele von Verfahrensvarianten im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 11 noch Ausführungsbeispiele von Verfahrensvarianten im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,

- Fig. 12 noch ein Ausführungsbeispiel von Verfahrensvarianten im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen,
- Fig. 13 schematisch den Aufbau eines herkömmlichen Massenspektrometers,
- Fig. 14 schematisch den Aufbau eines Massenspektrometers mit den erfindungsgemäßen Ausgestaltungen und Anordnungen,
- Fig. 15 ein Massenspektrogramm von Äthanol,
- Fig. 16 einen angenommenen Massenpeak von Pt 2+,
- Fig. 17 schematisch zwei Ausführungsbeispiele einer Leitfähigkeitsmeßzelle, und
- Fig. 18 schematisch ein Ausführungsbeispiel eines Frequenzgenerators.

Gleiche Bezugszeichen in den einzelnen Figuren und Abbildungen der Zeichnungen bezeichnen gleiche oder ähnliche oder gleich oder ähnlich wirkende Komponenten. Anhand der Darstellungen in der Zeichnung werden auch solche Merkmale deutlich, die nicht mit Bezugszeichen versehen sind, unabhängig davon, ob solche Merkmale nachfolgend beschrieben sind oder nicht. Andererseits sind auch Merkmale, die in der vorliegenden Beschreibung enthalten, aber nicht in der Zeichnung sichtbar oder dargestellt sind, ohne weiteres für einen Fachmann verständlich.

Einzelne Merkmale, die im Zusammenhang mit konkreten Ausführungsbeispielen angegeben und/oder dargestellt sind, sind nicht auf diese Ausführungsbeispiele oder die Kombination mit den übrigen Merkmalen dieser Ausführungsbeispiele beschränkt, sondern können im Rahmen des technisch Möglichen, mit jeglichen anderen Varianten, auch wenn sie in den vorliegenden Unterlagen nicht gesondert behandelt sind, kombiniert werden.

In den Fig. 1 bis 12 wird ein erster Aspekt der Erfindung zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Fig. 1 zeigt ein Molekül, wie γ IFN (identisch mit der Schreibweise gIFN), mit verschiedenen Modifikationsstellen, wobei 0. dem ganzen aktiven Molekül, 1. bis 3. den Abbauprodukten

ten und 4. bis 6. den Modifikationsstellen entspricht. Die Fig. 2 zeigt ein Molekül, wie gIFN, dem der N-terminus fehlt.

Nachfolgend wird der Aspekt der Erfindung betreffend die Bestimmung von Peptiden/Proteinen anhand eines Ausführungsbeispiels für die Vermessung in Blut, Plasma, Serum, Flüssigkeiten unter Darstellung mehrerer Lösungsmöglichkeiten für die Erreichung des Zieles näher erläutert.

Unter Bezugnahme auf die Fig. 3 wird ein monoklonaler Antikörper AK spezifisch für das C-Ende zu der Probe addiert. Daraufhin wird für einige Minuten geschüttelt. Diesem Antikörper AK ist eine Nachweismöglichkeit DD (= Defection Device) angekoppelt, die es erlaubt, über deren Konzentration die Menge der Antikörper-Moleküle AK und damit die der unbekannt zu bestimmenden Molekülmenge (Protein, Peptide etc.) qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

Antikörper AK sind vorzugsweise käuflich zu erwerben oder neu herzustellen. Das Prinzip gilt insbesondere für jedes zu messende Protein (Molekül), modifiziert oder verändert. Insbesondere ist bei dem gezeigten Beispiel in der Fig. 3 der Normalwert von γ IFN (identisch mit der Schreibweise gIFN) = 50 - 500 U/ml Blut = 2,5 - 25 ng/ml Blut.

Da die unbekannt zu messende Konzentration der Verbindung, die modifiziert, abgebaut, usw. ist und der z.B. ein N-terminales Ende oder ein C-terminales Ende fehlt, hier für γ IFN (identisch mit der Schreibweise gIFN), im femto- oder nanogramm Bereich (fg oder ng-Bereich) oder kleiner erwartet wird, ist die entsprechende Nachweismöglichkeit oder Defection Device DD vorzugsweise in der Lage, die zu messende Konzentration so zu vervielfältigen oder amplifizieren, dass die Messung der unbekannt Konzentration leicht beispielsweise auch in normalen Blutproben möglich ist. Dazu kann bei dem Bestimmungsverfahren für Peptide/Proteine vorgesehen sein, dass die Nachweismöglichkeit oder Defection Device DD selbst sehr groß ausgelegt wird und insbesondere in kleinere vorzugsweise gleiche Teile so zerlegt werden kann, dass deren Konzentration als bekannt vorausgesetzt und/oder leicht gemessen werden kann. Bei einer anderen Variante kann vorgesehen sein, dass diese Nachweismöglichkeit oder Defection Device DD selbst so vervielfältigt oder amplifiziert werden kann, dass eine Vermessung leicht mit bekannten Methoden möglich wird z.B. durch eine nachgeschaltete PCR-Reaktion. Die Nachweismöglichkeit oder Defection Device DD kann dann ein Magnetpartikel, eine RNA, eine DNA, ein Polylysin, ein Polysaccharid, ein Polypeptid, etc., sein, welches über PCR, magnetisch, elektrisch, elektrophoretisch (Blotting), gekoppelte

Farbstoffe (UV, IR, Lumineszenz, Fluoreszenz, usw.) leicht qualitativ und quantitativ vermessen werden kann.

Eine gekoppelte DNA oder RNA ist z.B. leicht in die Bestandteile zu zerlegen. Lediglich exemplarisch, aber mit Vorteil ist beispielsweise für die Vermessung einer unbekannt Menge an modifizierten γ IFN (identisch mit der Schreibweise gIFN), sind z.B. käufliche Poly-(Ad) oder Poly-(G; T; C)-Ketten (-Knäuel) geeignet, die mit einer beliebigen Kopplungsmethode an einen Antikörper AK im Rahmen der Erfindung zu koppeln wären. Diese Kopplungsmethoden werden z.B. in der DNA-Chip-Technologie routinemäßig benutzt zur Kopplung dieser Verbindungen an den Biochip (siehe Fig. 4). Dieser Komplex kann in der Probe (Blut etc.) nun direkt und/oder nach entsprechendem Abtrennen oder Waschen (Zentrifugation, DC-Platte, Säule- mittels u.a. polyklonaler AK's gegen das Gesamtmolekül sowie Verdauung des Gesamtmoleküls durch Proteasen, Peptidasen) nachgewiesen werden.

Hierzu ist in der Fig. 5 ein Beispiel angegeben. $DD_{\infty} = \text{Poly}(\text{Ad})_{\infty}$ ist über eine Chip- oder eine Mikrotiterplatte (oder andere Möglichkeiten) durch z.B. Hybridisierung über (T) bedeckte/belegte Oberflächen leicht aus der Probe zu isolieren oder abtrennen.

Der Nachweis wird mittels markierter Nukleotide, ^{125}J -Antikörper, etc. radioaktiv durchgeführt. Oder aber der Nachweis wird mittels gekoppelter PCR-Reaktion oder aber nach Verdauung der DNA-, RNA-, Poly(A)- (Ketten) mittels Säuren-Basen, DNAasen, RNAasen, Endonukleasen etc., mit anschließendem Enzym. Nachweis der freigesetzten Nukleotide durchgeführt (1. Verdauung mit gängigen Methoden zu Monophosphaten).

Weiterhin liegt im Rahmen des erfindungsgemäßen Peptid/Protein-Bestimmungsverfahrens eine Umwandlung mit Pi-Transferasen zu Di- und Triphosphaten, z.B.

- mit Phosphorsäuren, Polyphosphaten zu Diphosphaten, mit Kinasen zu Triphosphaten; oder
- mit Adeylatkinasen zu Diphosphaten, e.g. mit Myokinasen zu Diphosphaten (vgl. Fig. 6).

Der Nachweis der entstandenen Triphosphate/ATP erfolgt nun beispielsweise mittels nachgeschalteter enzym. (ATPase-) Messung mittels Biolumineszens (Luciferase/Luminometer).

Ebenfalls ist eine Messung über die Kinasen-Aktivität möglich. Die sensitivste Methode ist aber die Vermessung mittels gekoppelter Luciferase über Lumineszenz. Der Nachweis ist auch möglich über mit Fluoreszenz-Farbstoff-markierter RNA-F, DNA-F, polyNu-F (polylysin-F, polysaccharid-F, etc.) (vgl. Fig. 7).

Die Konzentrationsberechnung erfolgt z.B. gemäß der Ausführung entsprechend der Darstellung in der Fig. 8 als Verfahrensbestandteil I. Weiterhin gilt als Verfahrensbestandteil II. für C-Terminus fehlend: analog I., aber mit einem Antikörper AK speziell für das N-Ende gemäß Fig. 8a. Für fehlendes X, Y, (S) Z = Zucker gilt ein Verfahrensbestandteil III. analog I. mit Antikörpern AK speziell für diese modifizierte Moleküle, usw. Ein Verfahrensbestandteil IV. gilt für das modifizierte Molekül (γ IFN (identisch mit der Schreibweise gIFN)) mit poliklonalen Antikörpern AK gegen das modifizierte Molekül. Ein Verfahrensbestandteil V. ergibt für das ganze Molekül als Kontrolle = 0.

Resultat: Qualität und Quantität -

0. = unverändertes ganzes Molekül

1. - 3. Abbau-Produkte/Moleküle

4. - 6. modifizierte Produkte/Moleküle

z.B.: 0./1. Und 3. γ IFN (identisch mit der Schreibweise gIFN) (Konz.)

Die Auswertung erfolgt analog Fig. 9 unter Anwendung entsprechender Mathematik und (Computer)-Berechnung anhand der erhaltenen Kurven, Werte und/oder auch mittels Kompetitivem Assay!

Wenn bekannt ist, daß z.B. bei γ IFN (identisch mit der Schreibweise gIFN) nur ein Ende fehlt \Rightarrow I + II ergibt:

abgebaut + abgebaut plus (gesamtes) ganzes γ IFN \Rightarrow Diff. = Intaktes γ IFN

Für die verschiedenen nachzuweisenden Moleküle, wie γ IFN^C, γ IFN^N, γ IFN^X, γ IFN^Y, γ IFN^Z können verschiedene Nachweismöglichkeiten oder Defection Devices DD, oder anders ausgedrückt insbesondere Amplifier benutzt werden, was eine weitere Vereinfachung bringt:

Für γ IFN^C = gIFN = (Ad)poly,

γ IFN^N = gIFN = (T)poly,

γ IFN^X = gIFN = (G)poly,

γ IFN^Y = gIFN = (C)poly,

γ IFN^Z = gIFN = usw.

Die Oberflächen werden mit den entsprechenden Gegennukleotiden gekoppelt, so daß die Hybridisierung stattfinden kann. Dann erfolgt ebenso der Nachweis, wie aufgezeigt (Fig. 10).

Damit kann insbesondere realisiert werden vom einfachen ELISA zur Platte zum Chip = Proteinchip. Die Variante a) in der Fig. 10 betrifft eine Mikrotiterplatte, etc. zur Trennung oder

zum Nachweis. Die Variante b) in der Fig. 10 betrifft einen Chip, einen Schlauch (vorteilhaft z.B. bei der Dialyse) oder eine Säule, etc. zur Trennung oder zum Nachweis.

Nachweise der Polypeptide erfolgen nach Verdauung über gängige Assays, wie z.B. mit Ninhydrin (Edman-Abbau, usw.). Nachweise der Polyzucker, wie z.B. Chitisan, erfolgen durch Koppeln mit z.B. Farbstoffen, Abbau mit Chitobiose-Chitobiase, Nachweis wie beschrieben (Chelate, Flockungsmittel für Metalle).

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung des Komplexes, wie z.B. die weiter oben erläuterte Version mit DNA oder RNA wird mittels Atomic Force Mikroskopie (AFM)-Titration erreicht (vgl. Fig. 11). Hier werden die isolierten markierten Komplexe (eine Abtrennung ist auch über eine Immunfällung möglich) direkt aus den Trennsäulen, mittels Nanopipetten, usw. auf einen geeigneten Probenträger (Glas, Papier, Nylon, etc.) aufgebracht und zwar so, daß eine Reihe von Spots mit aufsteigender Konzentration entsteht, die nach Antrocknung (+-Fixierung mit z.B. Formalin, Kopplung mit Isothiocyanaten, Epoxy (-D3), NHS, usw.) mittels CCD-Kamera, Scintilationszähler, usw. und/oder mittels einer AFM-Nadel orthographisch vermessen und integriert werden können. Mit entsprechenden Standards kann dann eine direkte Konzentrationszugehörigkeit zur unbekanntenen Probe vorgenommen werden. Es ist damit möglich einige wenige Komplexe (Moleküle) direkt nachzuweisen und auf deren Konzentration in der ursprünglichen Probe (Blut, Serum, Plasma, etc.) zurückzurechnen.

Nachfolgend wird noch ein Ausführungsbeispiel betreffend Collagenase, Gelatinase-Aktivitätsnachweis im Blut, Serum, etc. erläutert. Addiere die Proteasen (u.a. MMP-1=Collagenase, MMP-2=GelatinaseA, MMP-3 (Stromelysin 1) und MMP-9 (Gelatinase B)

1. zur Probe und Kontrolle, inkubiere für bestimmte Zeitintervalle und messe anschließend mit den beschriebenen Methoden die Konzentration der Cytokine, Interferone, etc. (γ IFN, Interleukin-1(β), IGF BPs, IGFI usw.)
2. zur Probe oder Kontrolle mit Inhibitor oder Aktivator der Protenasen zur Vermessung der Wirkung der Inhibitoren oder Aktivatoren = zum Screenen von neuen Inhibitoren oder Aktivatoren = Therapie Kontrolle für diese Wirkstoffe zur Testung der Aktivität der Proteasen selbst und/oder zum Nachweis der Proteasen-Wirkung zum Nachweis der Cytokin-Wirkung, Nachweis der Wirkung auf die Zell-Oberfläche und deren Rezeptoren (Befreiung von z.B. TNF- α und FasL (MMP-7)).

Es ist auch eine Kombination der verschiedenen Assays auf einer Mikrotiterplatte oder auf einem Biochip möglich.

Weiterhin besteht die Möglichkeit der Bestimmung der verschiedenen Proteine, Peptide mittels monoklonalen Antikörpern gegen diese verschiedenen Moleküle, die an Glas, -Chip, Nylon, Gold, also irgendeinen geeigneten Träger gekoppelt sind. Diese Moleküle werden so aus den Proben (Blut, Seren, Plasmen, etc.) herausgefiltert. Zugabe von polyklonalen Antikörpern mit den Nachweismöglichkeiten oder Defection Devices DD, Waschen und Zugabe von Peptidasen, Proteasen, führt wiederum, wie beschrieben, zur Bestimmung der unbekanntenen Moleküle (vgl. Fig. 12).

Das Abtrennen und Zählen der Partikel-Nachweismöglichkeiten oder -Defection Devices DD ist auch über die Flow-Cytometrie möglich. Dies gilt allgemein für die bis hierher beschriebenen Methoden.

Die direkte Abtrennung von "defekten" Molekülen, ein Zuviel an Molekülen in den beschriebenen biologischen Systemen (Personen, Tieren, etc.), ist über angeschlossene Dialyse-Systeme oder entsprechende Bypass-Systeme (die z.B. direkt in den Blutkreislauf implantiert werden) mit den beschriebenen Methoden möglich.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele zum zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung betreffend Massenspektrometrie unter Bezugnahme auf die Zeichnung näher erläutert.

Die Fig. 13 zeigt den Aufbau eines herkömmlichen Massenspektrometers 1 mit einer Elektronenquelle 2, einem Beschleuniger 3, insbesondere mit negativem Potential, einem Magneten 4, einem Spalt 5 sowie einem Auffanggefäß 6. Weiterhin sind gezeigt eine Leitung 14 zu einer Vakuumpumpe (nicht gezeigt) und eine Zuführung 15 für eine Probe (nicht gezeigt).

Die Fig. 14 zeigt die Darstellung eines Massenspektrometers analog Figur 1 mit den erfindungsgemäßen Ausgestaltungen und Anordnungen: Ventil/Schalter 7, heizbarer Probenraum mit Ofen 8, (Luft, Gas-)CO-Quelle/Reservoir 9, Ventil 10 sowie Ventil 11 (Drei-Wege-Ventile).

Von besonderem Vorteil ist bei der vorliegenden Erfindung, dass ein herkömmliches Massenspektrometer mit den erfindungsgemäßen Merkmalen erweitert werden kann und damit einen optimalen Funktions- und Wirkungsumfang zum Einsatz für jegliche Messungen bietet. Bei einer solchen Ausführung ist die Elektronenquelle 2 entsprechend der schematischen Darstellung in der Fig. 14 mittels des Ventils/Schalters 7 abschaltbar und der beheizbare Probenraum mit Probe 8 und CO (Luft, Gas, Trägergas) -Quelle 9 mittels Ventilen (insbesondere Dreiwegeventilen) 10 und 11 an das Massenspektrometer 1 anschließbar. Ebenso sind Abgase

(Luft, Atmosphäre, Autoabgase) über das Ventil 11 zuführbar. Der beheizbare Probenraum 8 ist mittels eines Verschlusses 12 zu öffnen und mit einem Probenträger/einer Probe 13 beladbar.

Alternativ oder zusätzlich kann vorgesehen sein, dass der Probenraum 8 mit der Probe, wie z.B. Blut oder anderen metallhaltigen Fluiden unter Zuhilfenahme des Verschlusses 12 beladen werden kann. Weiter kann vorgesehen sein, dass die CO-Quelle 9 sowie der Probenraum 8 mit der Probe 13 über die Ventile 10 und 11 mit dem Massenspektrometer 1 verbunden werden. Die Probe wird im beheizbaren Probenraum aufgeheizt (z.B. auf 300°C), wobei sich flüchtige Metallcarbonyle bilden, die mittels Vakuumpumpe und Beschleuniger 3 durch den Magneten 4 sowie den Spalt 5 in das Auffanggefäß 6 gelangen, nachdem sie detektiert wurden. Abgase, wie z.B. Autoabgase, Luft, Atmosphäre, usw. werden über Ventil 11 direkt in das System eingeleitet und vermessen/detektiert.

Zur Eichung wird eine bekannte Menge an Me-Carbonyl, oder Me plus CO unter identischen Bedingungen eingegeben und vermessen, und zwar mit oder ohne die unbekannte Probe:

Eichung: I) bekannte Menge Me-Carbonyl
 II) bekannte Menge Me plus CO
 III) unbekannte Probe
 IV) unbekannte Probe plus bekannte Menge an Me

Die Detektionsgrenze liegt vorzugsweise in der Nähe von 0,1 pmol/µl Probe.

Die Fig. 15 zeigt als Beispiel das Massenspektrogramm von Äthanol. Die Fig. 16 zeigt als Beispiel den angenommenen Massenpeak von Pt 2+.

Analog zur Bildung und Vermessung von flüchtigen Metallcarbonylen können auch andere flüchtige Metallverbindungen in diesem beschriebenen System, nach Austausch der CO-Quelle gegen andere Gase/Trärgase, gebildet und vermessen/detektiert werden. So sind damit auch atmosphärische Gase, Metallverbindungen, -komplexe leicht detektierbar. Das heißt, kompakte Leichtbaugeräte können mittels meteorologischen Wettersonden (Radiosonden) und deren Auswertegeräten (Bodenstationen) für Zustandsgrößen der Luft in Höhen bis z.B. 45 km eingesetzt werden und ein Zustandsbild der Atmosphäre liefern. Zusammen mit den Bodenmessungen ergibt sich so ein Gesamtzustand unserer Lufthülle mit Austausch. Der Einfluß der Metalle auf die Entstehung des O3-Loches, sowie der Entstehung des Treibhauseffektes kann damit exakt vermessen und bestimmt werden. Schuld an diesen Effekten haben u.a. diese in die Atmosphäre geblasenen Metalle, was hiermit leicht und kostensparend nachgewiesen

werden kann. Der Einsatz von ICP-MS-Geräten, welche sehr kostenintensiv und aufwendig sind, wird damit überflüssig.

Die Metalle können auch mittels enzymatischer Reaktion bestimmt werden. Dazu werden diese Metalle in entsprechende Enzymlösungen eingetragen, welche spezifisch mit diesen Metallen reagieren, d.h. aktiviert werden (z.B. Nickel aktivierte Horse radish Peroxidase, Me-Proteasen, Superoxiddismutase, Glutathione-Peroxidase, usw.). Die Bestimmung der entstehenden Peptide, Aminosäuren, etc., mittels z.B. PCR-Reaktion oder den Methoden die weiter oben beschrieben wurden, ergibt die Konzentration der Metalle. Auch die spezifische Inaktivierung verschiedener Enzyme, durch diese Metalle kann zur Bestimmung der Metalle benutzt werden (und umgekehrt), es sind dies Proteasen, Peptidasen, Transferasen, usw.

Durch Mutation und Rekombination können für einzelne Metalle spezifische Enzyme kombiniert und hergestellt werden, welche nur mit einem bestimmten Metall reagieren und damit zu deren Bestimmung geeignet sind. Sofern diese Enzyme einen Chromophor tragen, welcher sich dabei in seinen Eigenschaften ändert, kann die Konzentration des Moleküls hiermit direkt vermessen werden:

Eine Mikrotiterplatte (z.B. ein Chip, etc.), die mit Glutathion, Metallothionin, Transferrin, Ferritin, Dextrin (oder einem anderen Chelatbildner, Fusionsprotein, etc.) bedeckt ist, bindet z.B. Nickel aus einer Probe (Flüssigkeit, Luft, u.a.) (1), eine rekombinante Horse radish Peroxidase wird aktiviert (2), und kann mittels Substraten, wie z.B. Polyhistidin und PCR (u.a.)-Detektion die Konzentration von Nickel in der Probe ergeben.

Aeroallergene, wie Metallionen, können über BSA-Filter/Säulen angereichert werden und in/aus diesen Filtern/Säulen dann mit den beschriebenen Methoden detektiert werden.

Zur Bestimmung dieser Ionen kann dann auch ein Leitfähigkeitsfeststeller dienen, wie er nachfolgend im Zusammenhang mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung erläutert wird. Insbesondere werden dabei durch Me-Ionen definiert Redoxpotentiale in biol.Systemen, u.a., vermessen.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele zum dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung betreffend Leitfähigkeitsmessung und Leitfähigkeitsfeststeller unter Bezugnahme auf die Zeichnung näher erläutert.

Die Erfindung im Rahmen dieses Aspektes besteht darin, eine Blutprobe in einem Meßtubus einzuführen, der von einer Vielzahl von Elektroden umgeben ist. Die Elektroden werden nach einem bestimmten Schema kreuzweise mit einem Frequenzgenerator angesteuert. Mit dieser Methode ist es beispielsweise möglich, bestimmte Redox-Zustände zu messen, insgesamt ist es möglich, die individuelle Reaktion des Patienten auf bestimmte Zugabestoffe zu messen.

Die Entwicklung dieser Redox-Meßzelle/-Leitfähigkeitsmeßzelle ermöglicht die "äx vivo" (in vivo)-Vermessung des Potentials über einer (biol.) Probe, Blutprobe (Zelle(n), über Zellbestandteilen, Membranen - Mitochondrien, Bakterien (etc.), Zellkernen-Cytosol, Lösungen; Blut und dessen Bestandteilen/Serum, Plasma; etc., mit und ohne verschiedene Verbindungen, unter verschiedenen Behandlungen, Bedingungen.

Die Fig. 17 zeigt ein Beispiel für den Aufbau einer Leitfähigkeitsmeßzelle 100 mit Elektroden 102, einer Öffnung 103, sowie Zuleitungen 104 für einen Frequenzgenerator 105 (Fig. 18).

Die Leitfähigkeitsmeßzelle 100 wird in Kugelform (Fig. 17, Beispiel a)) ausgelegt, wobei eine Seite für die Addition verschiedener Substanzen, Zusatzstoffe, etc., offen ist. Das innere Gesamtvolumen der Leitfähigkeitsmeßzelle 100 beträgt vorzugsweise ca. 0,5 ml betragen. Geeignetes Elektrodenmaterial wäre z.B. Gold. Ein elektromagnetisches Drehfeld, insbesondere konstant zirkulierend und/oder oszillierend, wird mittels des Frequenzgenerators 105 (Fig. 18) erzeugt.

Alternativ ist die Leitfähigkeitsmeßzelle 100 in Durchlauform (Fig. 17, Beispiel b)) ausgelegt, wobei die Leitfähigkeitsmeßzelle 100 für den Durchlauf von Flüssigkeiten (wie z.B: Blut) oben und unten offen ist. Öffnungen 103 und 107 sind mit einem Netz 106 und 108 versehen. Die Leitfähigkeitsmeßzelle 100 kann als Perfusionszelle benutzt werden.

Es werden vorzugsweise mindestens 2 Leitfähigkeitsmeßzellen 100 in Serie geschaltet, wobei mindestens eine Leitfähigkeitsmeßzelle 100 als Kontrolle fungiert. Ein Computer (PC) kontrolliert Spannung/Strom sowie den Widerstand und sorgt gleichzeitig für den Wechsel zwischen den Meßzellen innerhalb eines Experiments.

Die Fig. 18 zeigt in einem groben Meßaufbau die Kopplung der Leitfähigkeitsmeßzelle 100 an den Frequenzgenerator 105 über die einzelnen Elektroden 102. Wobei die jeweils gegenüberliegenden Elektroden als Elektrodenpaare (plus und minus) an den Generator 105 angekoppelt sind. Insgesamt sind 4 solcher Elektrodenpaare vorhanden, die so an den Generator angeschlossen sind (I₁ bis I₄). Die Strom-/Spannungsermittlung erfolgt per PC 110, und aus diesen

Ergebnissen wird die Impedanz $R = U_1/I_1$ (Gleichstromwiderstand) ermittelt. Der Strom wird durch die Stromquelle (105) konstant gehalten (z.B. bei 1mA), so daß nur die Spannung vom PC aufgezeichnet werden muß. Es wird ein repräsentativer Kanal in die Messung aufgenommen (U_1). Der Frequenzgenerator 105 arbeitet als Stromquelle mit 4 Ausgangskanälen (I_1 bis I_4) dessen Strom- bzw. Spannungs-Phasen jeweils um 90° verschoben sind (i_1 bis i_4 , mit O_1 bis O_4 , 11) was zu einem Drehfeld führt, das zur Stabilisierung der Probe dient. Zur Verstärkung der Signale/der Spannung U_1 wird vor den Computer 110 ein Verstärker 109 zum Abgriff der Spannung U_1 am Frequenzgenerator 105 zwischengeschaltet. Mit bekannter Zell-/Partikelzahl in der Leitfähigkeitsmeßzelle 100 kann das Verhalten (Redox, usw.) einer einzelnen Spezies in der Meßzelle ausgemessen werden.

Es kann die Vermessung verschiedener Redoxpotentiale (wie Fe^{2+}/Fe^{3+} ; Ascorbat; Glutathion, Aminosäuren, etc.) erfolgen und damit standardisiert werden für die Ausmessung der einzelnen (Zellen)Biosysteme u.a. auch von Prionen-Proteinen, in Abhängigkeit verschiedener Bedingungen (Bezug zu BSE, Kreuzfeld-Jakob), von Allergien, Asthma in Bezug zur Addition/Wirkung von Metallen, ROS.

Die Erfindung ist anhand der Ausführungsbeispiele in der Beschreibung und in den Zeichnungen lediglich exemplarisch dargestellt und nicht darauf beschränkt, sondern umfaßt alle Variationen, Modifikationen, Substitutionen und Kombinationen, die der Fachmann den vorliegenden Unterlagen insbesondere im Rahmen der Ansprüche und der allgemeinen Darstellungen in der Einleitung dieser Beschreibung sowie der Beschreibung der Ausführungsbeispiele und deren Darstellungen in der Zeichnung entnehmen und mit seinem fachmännischen Wissen sowie dem Stand der Technik insbesondere unter Einbeziehung der vollständigen Offenbarungsgelalte der am Anfang dieser Beschreibung angegebenen älteren Anmeldungen kombinieren kann. Insbesondere sind alle einzelnen Merkmale und Ausgestaltungsmöglichkeiten der Erfindung und ihrer Ausführungsbeispiele kombinierbar.

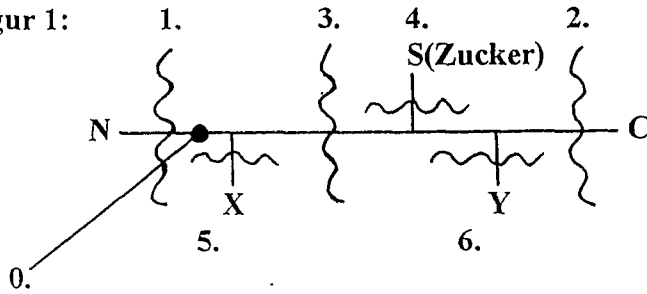
Verfahren zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen, Massenspektrometrie für Metalle und Leitfähigkeitsfeststellung

Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Peptiden/Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass Peptide/Proteine an deren C-Ende, N-Ende und/oder deren modifizierten Stellen sowie in ihrer Gesamtheit mit spezifischen Antikörpern vermessen werden, die derart markiert sind, dass eine spätere Vermessung möglich ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass an den Antikörpern eine Nachweismöglichkeit (Defection Device) angekoppelt wird, die es erlaubt, über deren Konzentration die Menge der Antikörpermoleküle und damit die der unbekannt zu bestimmenden Molekülmenge qualitativ und/oder quantitativ zu bestimmen.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweismöglichkeit (Defection Device) ausgelegt ist, die zu messende Konzentration so zu vervielfältigen oder amplifizieren.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweismöglichkeit (Defection Device) selbst sehr groß ausgelegt wird und insbesondere in kleinere vorzugsweise gleiche Teile so zerlegt werden kann, dass deren Konzentration als bekannt vorausgesetzt und/oder leicht gemessen werden kann.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweismöglichkeit (Defection Device) selbst so vervielfältigt oder amplifiziert werden kann, dass eine Vermessung leicht mit bekannten Methoden möglich ist.
6. Massenspektrometer, dadurch gekennzeichnet, dass eine Trägergasquelle, insbesondere eine CO-Quelle, vorgesehen ist, um eine Probe mit Trägergas, entsprechend insbesondere CO, zu beschließen, oder dass ein Enzymlösungsbehälter mit/für eine Enzymlösung zur Reaktion mit wenigstens einem Metall vorgesehen ist.

7. Metallbestimmungsverfahren, dadurch gekennzeichnet, dass eine Probe mit Trägergas, insbesondere CO, von einer Trägergasquelle, entsprechend insbesondere einer CO-Quelle, beschossen wird, oder dass eine Enzymlösung mit wenigstens einem Probenmetall reagiert.
8. Leitfähigkeitsmessung, dadurch gekennzeichnet, dass eine Blutprobe in einen Meßtubus eingeführt wird, der von einer Vielzahl von Elektroden umgeben ist, und dass die Elektroden nach einem vorgegebenen Schema kreuzweise mit einem Frequenzgenerator angesteuert werden.
9. Leitfähigkeitsfeststeller, dadurch gekennzeichnet, dass für die Einführung einer Blutprobe ein Meßtubus vorgesehen, der von einer Vielzahl von Elektroden umgeben ist, die nach einem vorgebbaren Schema kreuzweise mit einem Frequenzgenerator ansteuerbar sind.

Figur 1:

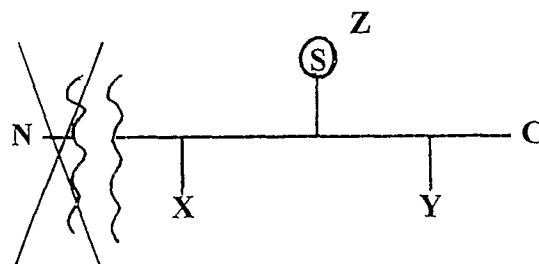


Kontrolle:

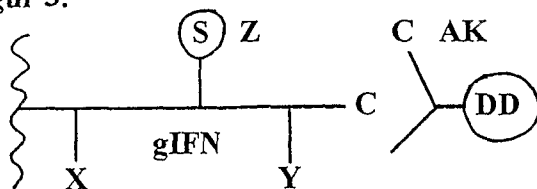
- 0. ganzes Molekül
(aktives Molekül)
- 1.-3. Abbauprodukte
- 4.-6. Modifikationen

Figur 2:

1. N-Terminus fehlt:



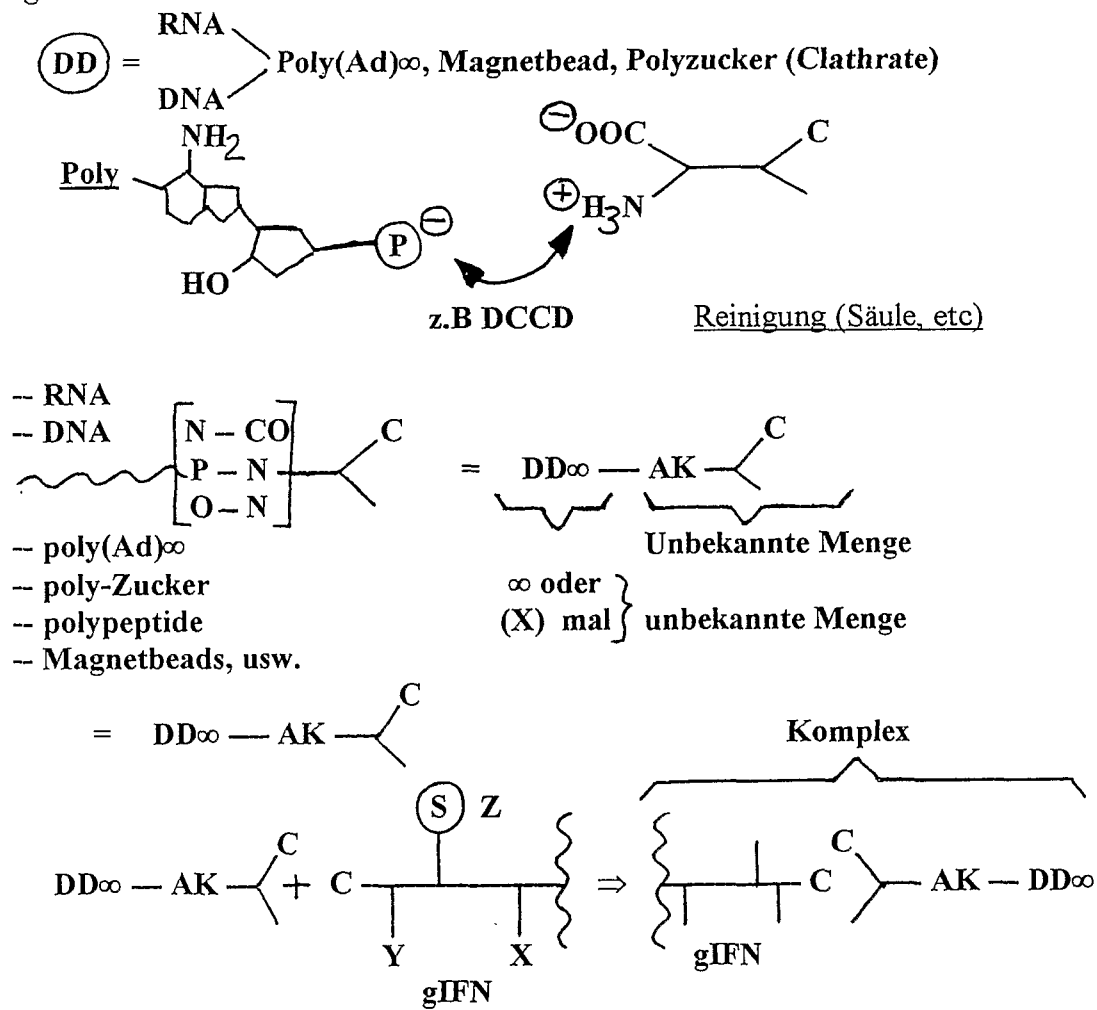
Figur 3:



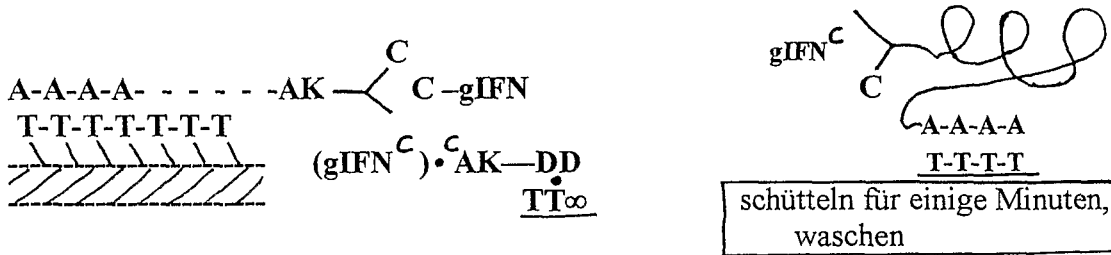
Proteine, Peptide, gIFN, etc

Normalwert von gIFN = 50 – 500 U/ml Blut = 2,5 – 25 ng/ml Blut

Figur 4:

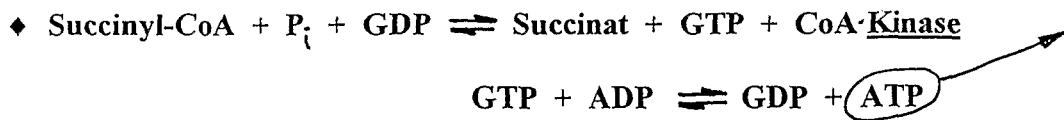
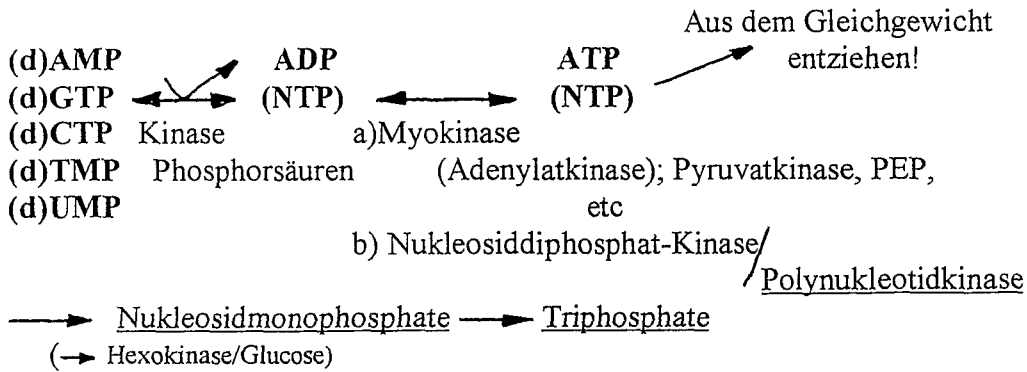


Figur 5:

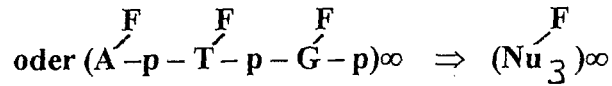
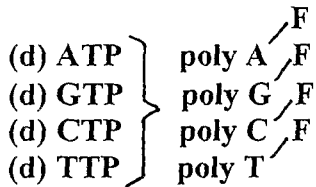


≡ identisch über entsprechende Säulen zur Trennung oder präparierte Schläuche (Nylon; Blut, Dialyse)

Figur 6:

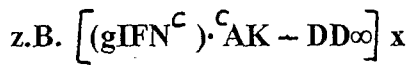


Figur 7:



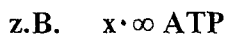
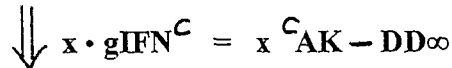
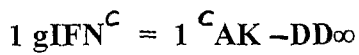
und Detektion der Fluoreszenz über die in 2 beschriebenen Methoden.

Figur 8:

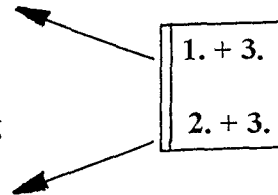


x = Anzahl der gIFN^C-Moleküle

↓ Verdauung und Umwandlung in Triphosphate:

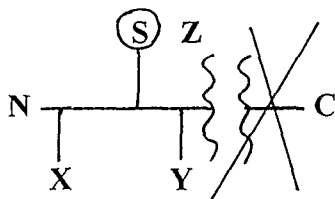
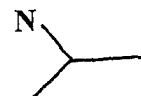


↑
Vervielfältigungsfaktor/Amplifizierung

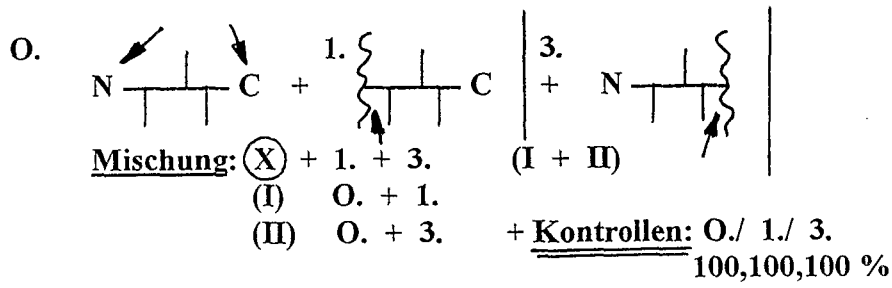


Figur 8a:

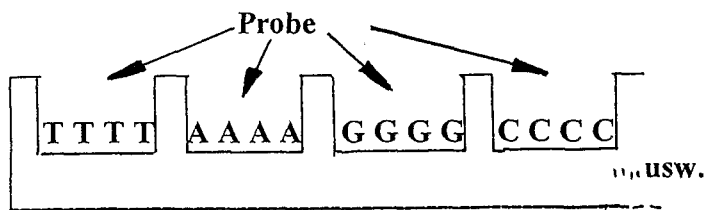
Für C-Terminus fehlend: analog I, aber mit einem Antikörper Spez. für das N-Ende →



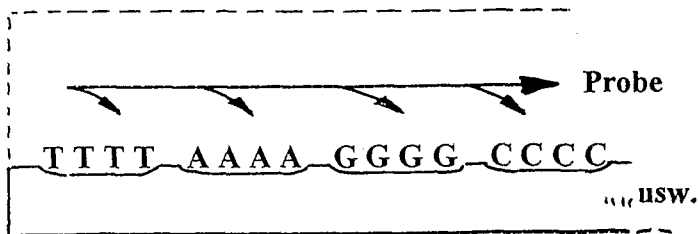
Figur 9:



Figur 10:

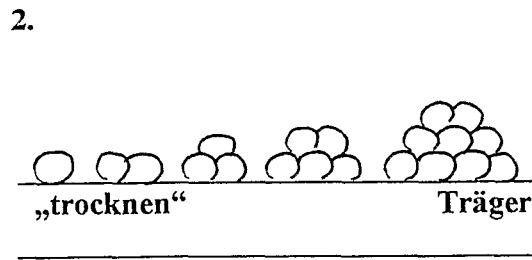
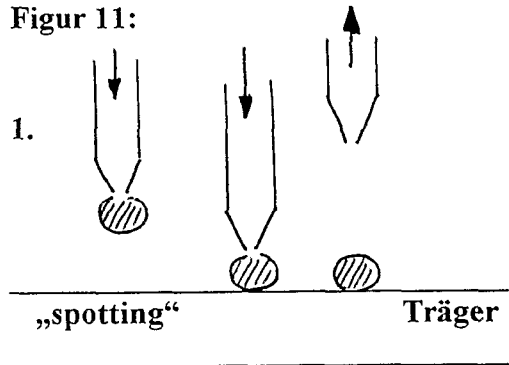


a)

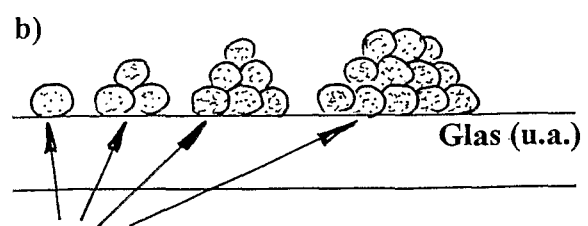
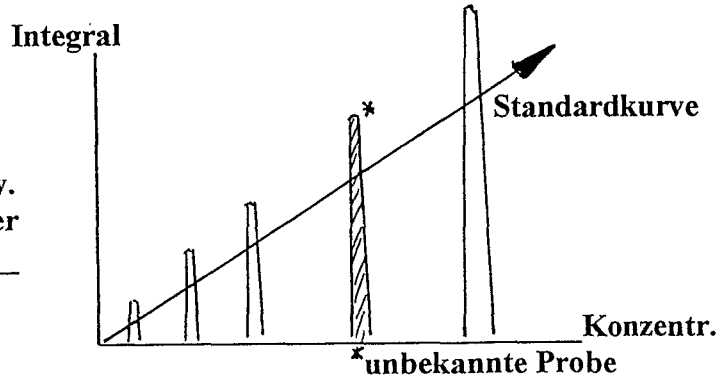
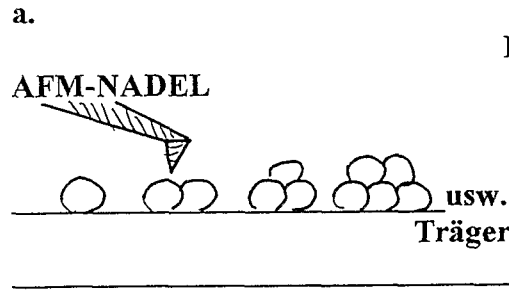


b)

Figur 11:



(gefriertrocknen, lufttrocknen, etc. +/-
Kopplung mittels Isothiocyanate, Epoxy,
NHS, etc.)

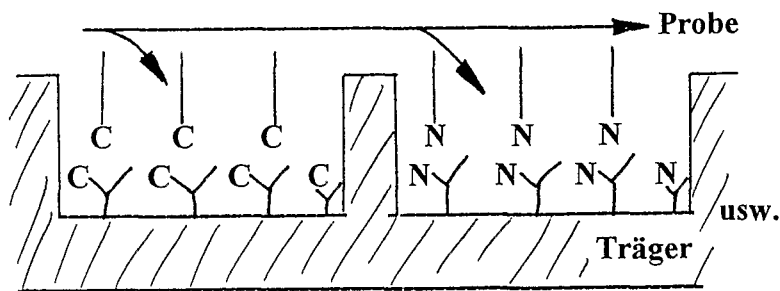


Markierung: DD's
(Fluoresc., Luminesc., etc.)

Detektion: Licht, Radioakt. (Laser, CCD-Kamera, Scintillationsz.)

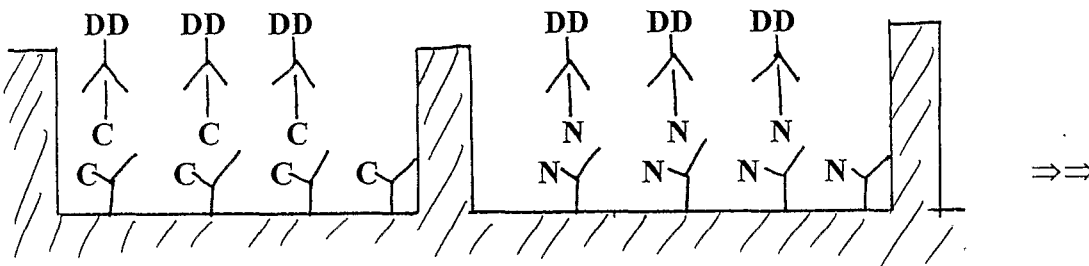
Fig. 12

a)

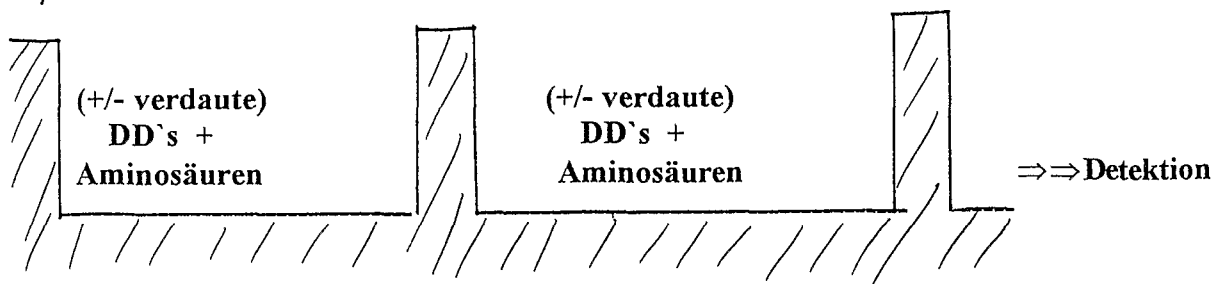


waschen
 ⇒⇒
 + polykl. AA's (b)
 waschen
 + Peptidasen (Proteasen) (c)

b)



c)



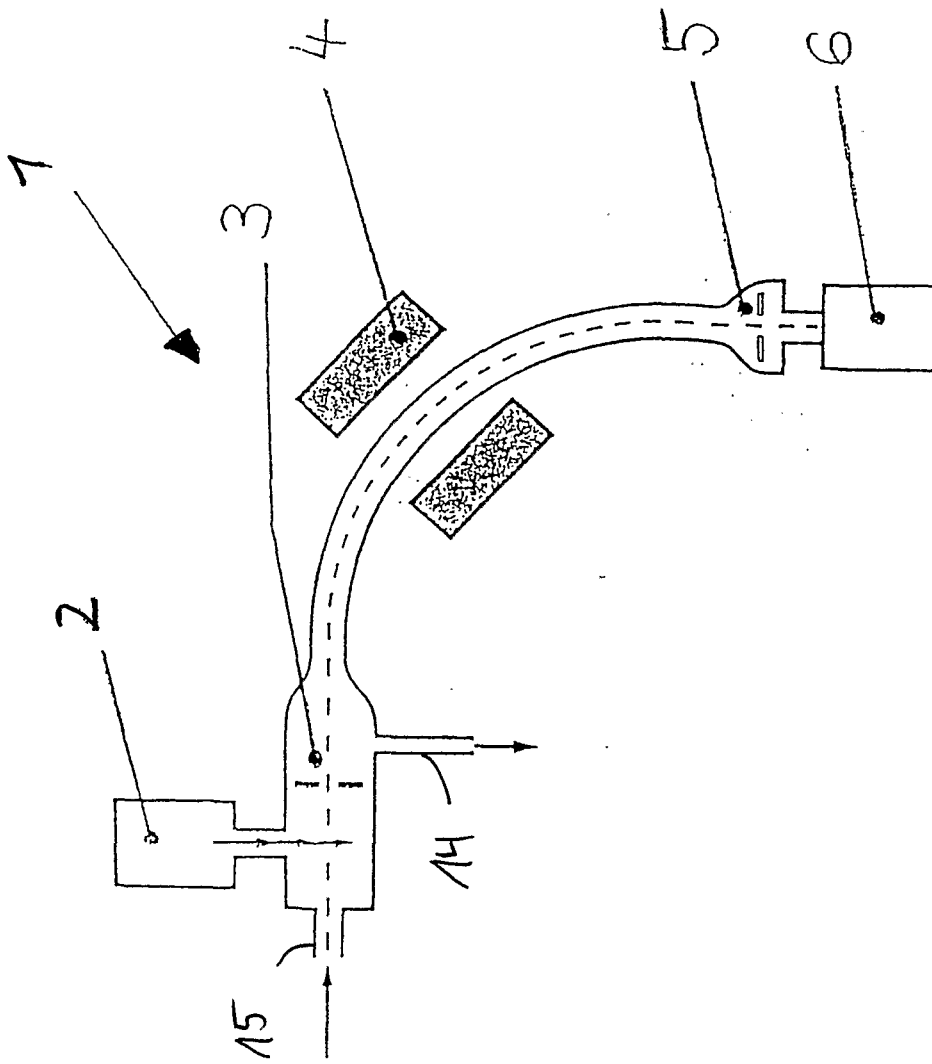


Fig. 13

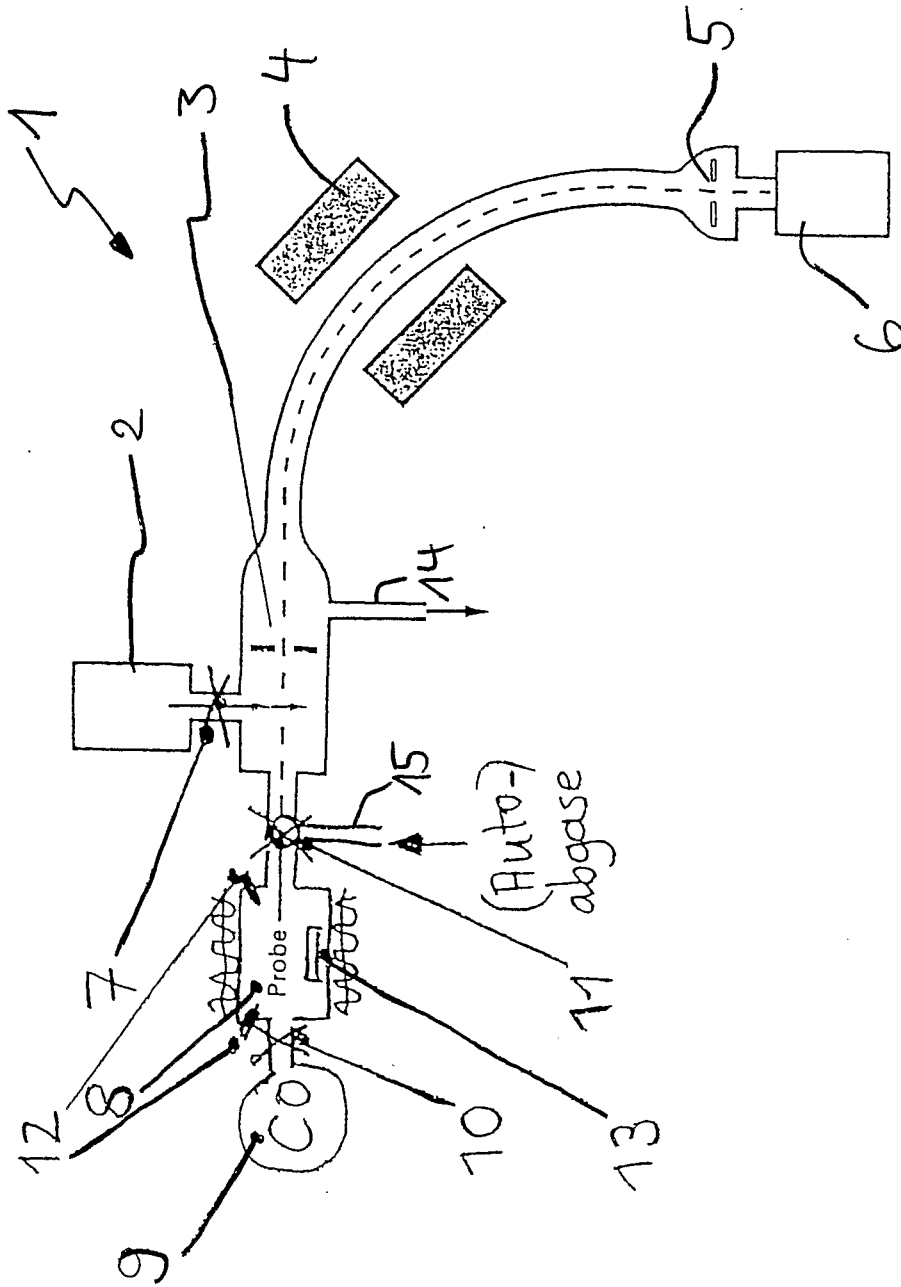


Fig. 14

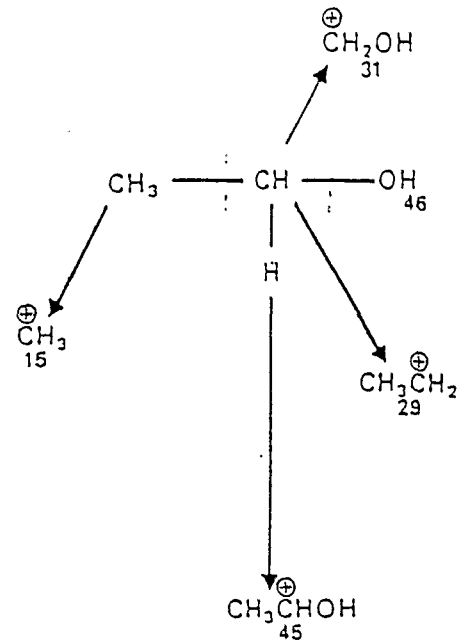
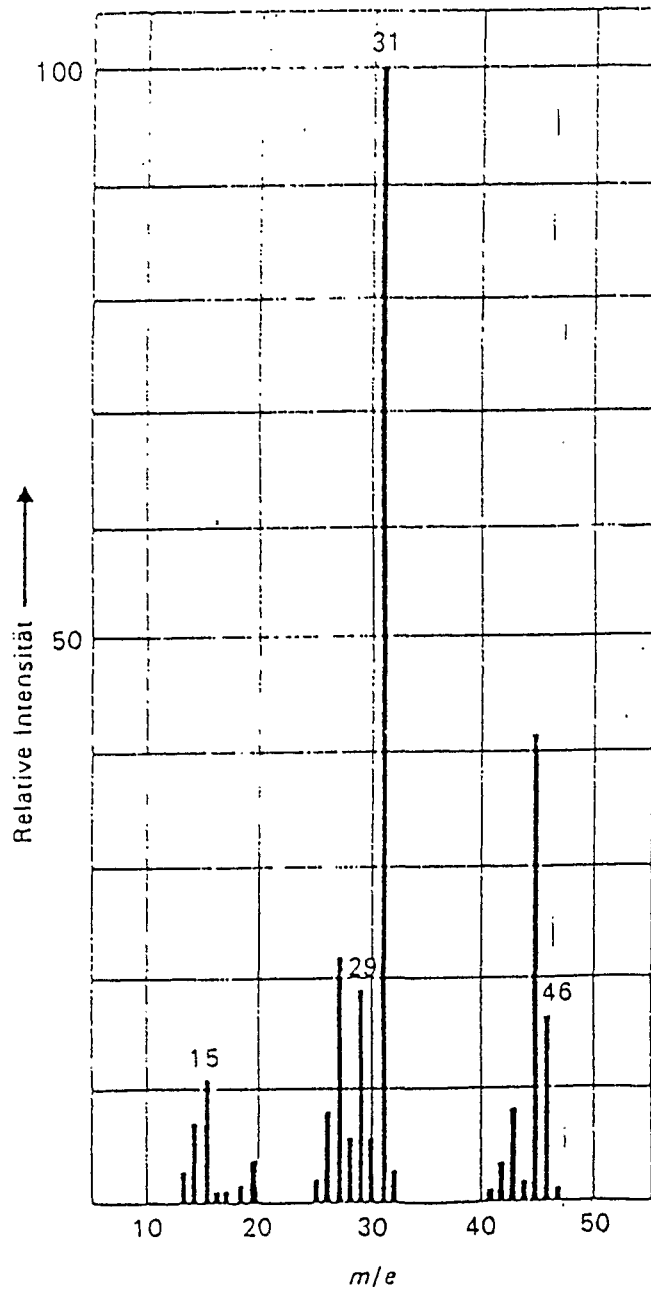


Fig. 15

Fig. 16

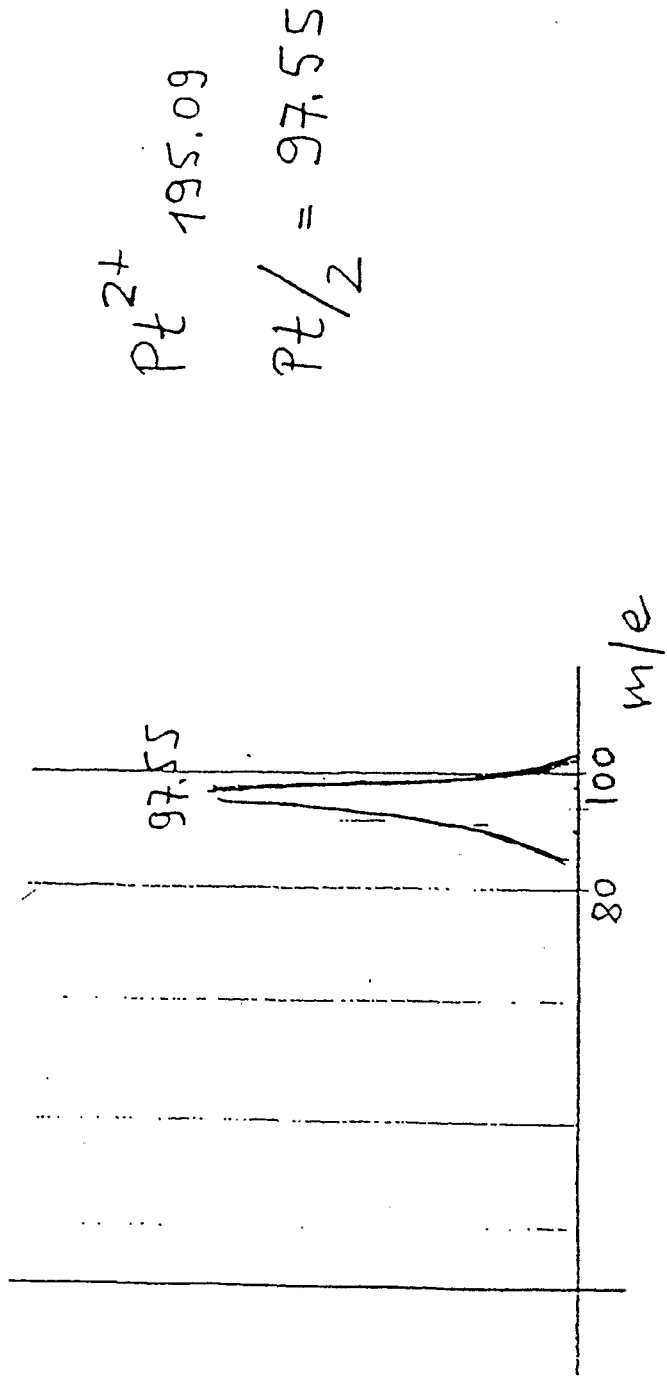
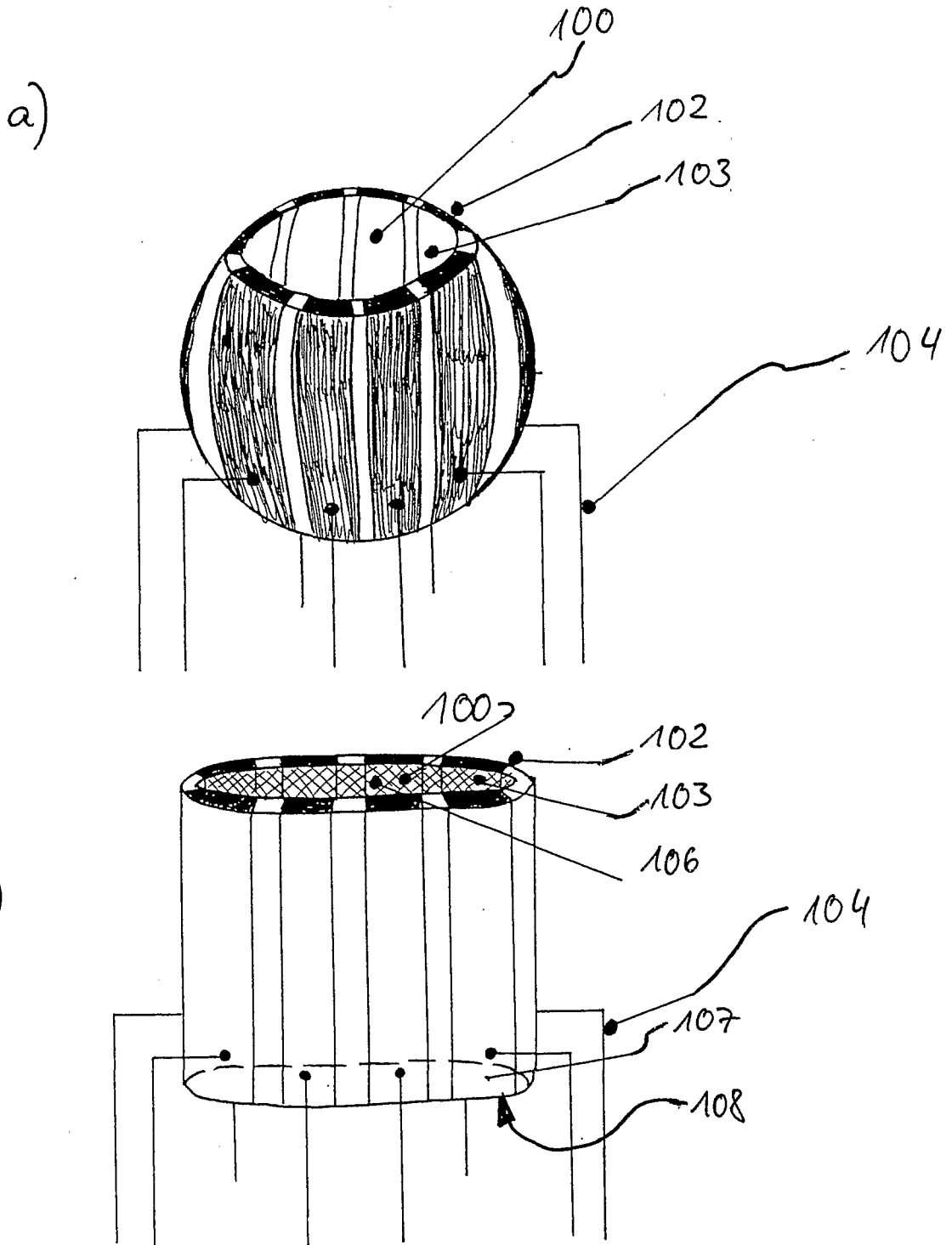


Fig. 17



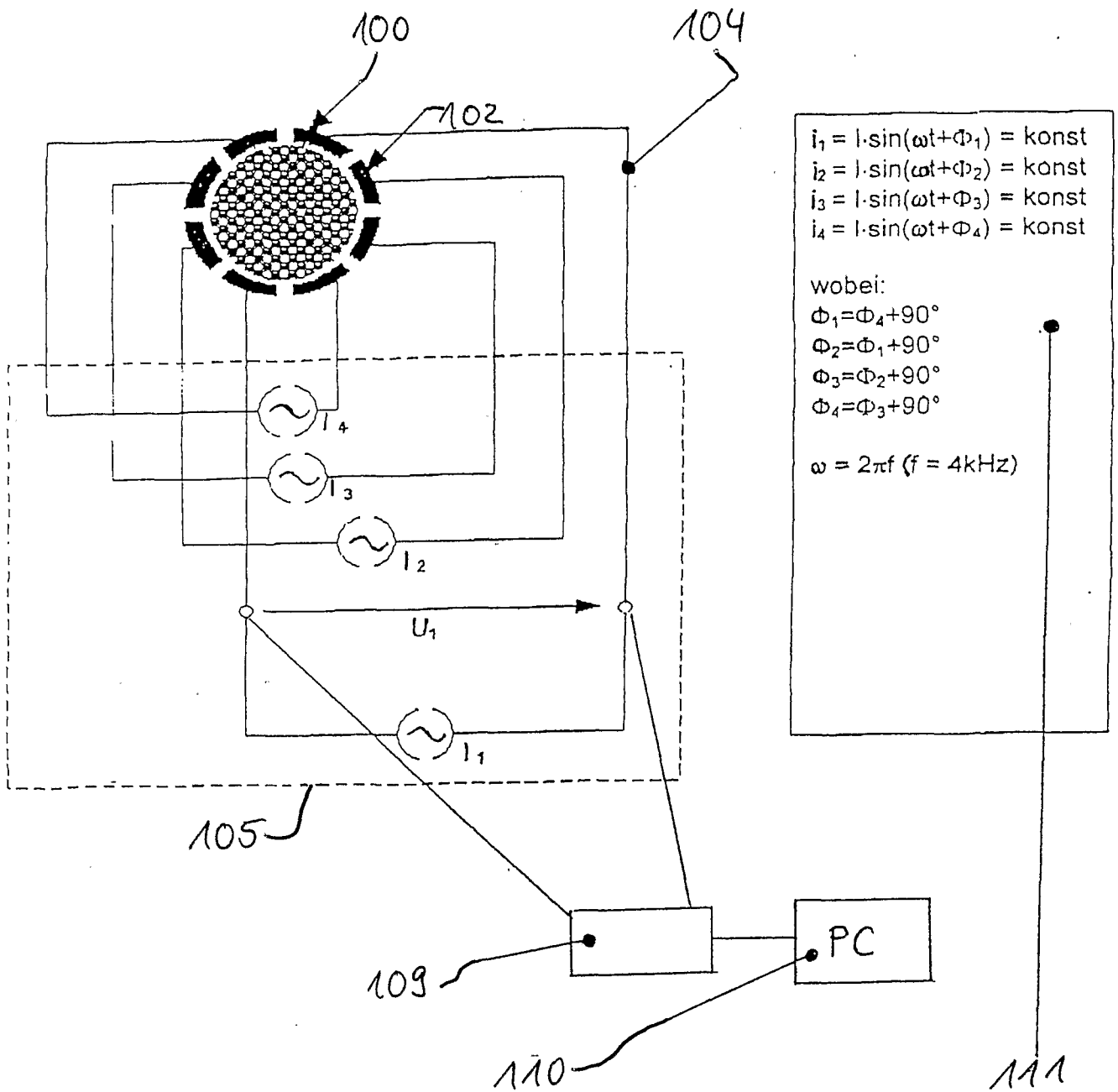


Fig. 18