



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl. 3: G 01 N 33/54

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

627 281

⑳① Gesuchsnummer: 6459/75

⑳③ Inhaber:
Technicon Instruments Corporation,
Tarrytown/NY (US)

⑳② Anmeldungsdatum: 20.05.1975

⑳③① Priorität(en): 20.05.1974 GB 22377/74

⑳⑦ Erfinder:
Pierre Lucien Masson, Bruxelles (BE)
Joseph Felix Heremans, Leuven (BE)

⑳④ Patent erteilt: 31.12.1981

⑳⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 31.12.1981

⑳④ Vertreter:
Georg Römpler, Heiden

⑵④ **Verfahren zur Analyse biologischer Fluide.**

⑵⑦ Es wird ein Verfahren zum Analysieren einer biologischen Fluidprobe auf Antikörper, Antigene oder Komplexen aus Antikörpern und Antigenen beschrieben, bei der die Probe mit einer Lösung von Rheumatoidfaktor (RF) versetzt wird, um zwischen RF und den in der Probe gebildeten oder vorhandenen Antikörper/Antigen - Komplexen eine Bindung zu bewirken. Anschliessend wird das auf diese Weise hergestellte Gemisch auf an RF gebundene Komplexe analysiert.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Analysieren einer biologischen Fluidprobe auf Ak, Ag oder Ak:Ag-Komplexe, dadurch gekennzeichnet, dass der Probe eine Lösung von RF zugesetzt wird, um zwischen RF und den gebildeten oder vorhandenen Ak:Ag-Komplexen eine Bindung zu bewirken, und das erhaltene Gemisch auf an RF gebundene Komplexe analysiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es dem Nachweis oder der Bestimmung eines Ak:Ag-Komplexes dient, dass der Probe eine Lösung von RF zur Bindung des RF an den Ak:Ag-Komplex sowie ein Material zugesetzt wird, das bei Berührung mit RF zur Agglutination veranlasst wird, und die Analyse des Gemisches auf an RF gebundene Ak:Ag-Komplexe dadurch erfolgt, dass festgestellt wird, in welchem Ausmass im Vergleich zu einem Standardgemisch aus dem Material und RF eine Agglutination des Materials auftritt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Material ein Immunglobulin enthält, mit dem inerte Trägerteilchen überzogen sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Teilchen Polystyrol enthalten.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es dem Nachweis oder der Bestimmung eines bestimmten Ak oder Ag dient, der Probe ein in bezug auf den bestimmten nachzuweisenden Ak spezifisches Ag oder ein in bezug auf das bestimmte nachzuweisende Ag spezifischer Ak zugesetzt wird, um mit jedem der bestimmten vorhandenen Ak oder Ag einen Ak:Ag-Komplex zu bilden, und dass die An- oder Abwesenheit eines solchen Komplexes dadurch festgestellt wird, dass der Probe eine Lösung von RF zur Bindung des RF an den Ak:Ag-Komplex sowie ein Material zugesetzt wird, das bei Berührung mit RF zur Agglutination veranlasst wird, und die Analyse des Gemisches auf an RF gebundene Ak:Ag-Komplexe dadurch erfolgt dass festgestellt wird, in welchem Ausmass im Vergleich zu einem Standardgemisch aus dem Material und RF eine Agglutination des Materials auftritt.

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es dem Nachweis oder der Bestimmung von Ak:Ag-Komplexen in einer biologischen Fluidprobe dient, dass der Probe eine bekannte RF-Menge und eine bekannte Menge an mit IgG überzogenen Latexteilchen zugesetzt werden, wodurch RF an jedweden vorhandenen Ak:Ag-Komplex gebunden wird und restlicher RF eine Agglutinierung der Latexteilchen bewirkt, und dass die Analyse des erhaltenen Gemisches auf an RF gebundene Ak:Ag-Komplexe dadurch erfolgt, dass die Menge des restlichen RF bestimmt wird, indem die agglutinierten Latexteilchen gezählt werden und das Ergebnis mit einer Standardkurve verglichen wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es der Analyse eines bestimmten Ak oder Ag in einer biologischen Fluidprobe dient und dass

a) der Probe ein Überschuss eines gegenüber dem in der Probe befindlichen Ak spezifischen Ag' oder eines gegenüber dem in der Probe befindlichen bestimmten Ag spezifischen Ak' zugesetzt wird, um einen Ak:Ag'-Komplex oder einen Ak':Ag-Komplex zu bilden, wobei Ak' oder Ag' eine Identifizierungskennung tragen,

b) dem im Schritt a) gebildeten Gemisch eine Lösung von RF in einer solchen Menge zugesetzt wird, die mindestens ausreichend ist, um den gesamten Ak:Ag'-Komplex oder den gesamten Ak':Ag-Komplex in dem Gemisch zu binden, und

c) die Menge an Ak' oder Ag', die frei in der Probe ist oder die an RF gebunden ist, gemessen wird und aus diesem Messergebnis die in der ursprünglichen Probe vorhandene Menge des bestimmten Ak oder Ag berechnet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Identifizierungskennung ein Enzym oder Koenzym gewählt wird, derart, dass die Aktivität des Enzyms oder Koen-

zyms nach erfolgter Bindung des Ak':Ag-Komplexes oder des Ak:Ag'-Komplexes an RF gehemmt ist, und dass die Menge des freien Ak' oder Ag' durch Messen der Enzym- oder Koenzymaktivität in dem Gemisch bestimmt wird, ohne dass zuvor das mit RF gebundene Ak':Ag oder Ak:Ag' entfernt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das mit RF gebundene Ak':Ag oder Ak:Ag' aus dem Gemisch entfernt wird und dass danach die in dem Gemisch verbleibende Menge von Ak' oder Ag' gemessen wird.

10. Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 bei der kontinuierlichen Durchflussanalyse biologischer Fluidproben.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Analyse von biologischen Fluiden, beispielsweise von Harn oder Serum, zur Bestimmung der Anwesenheit, der Menge und/oder der Natur von Antikörpern, Antigenen und Antikörper:Antigen-Komplexen.

Der Einfachheit halber werden im folgenden die Symbole «Ak», «Ag», und «Ak:Ag» für «Antikörper», «Antigen» bzw. «Antikörper:Antigen-Komplex» benutzt.

Bekanntlich ist es wichtig, dass man biologische Fluide auf Ak, Ag und Ak:Ag-Komplexe analysiert. Sp sind beispielsweise viele Krankheiten durch die Anwesenheit von Ak:Ag-Komplexen im Kreislauf gekennzeichnet. Bei dem Ag kann es sich um eine grosse Vielfalt von Proteinen handeln, und zwar einschliesslich von solchen Proteinen, die auf die Gegenwart von Bakterien oder Viren zurückzuführen sind, oder von solchen freigesetzt sind. Die Ak sind natürlich für das besondere Ag spezifisch, und es handelt sich vorwiegend um Immunglobuline der Klasse IgG, die durch das Lymphsystem des Lebewesens synthetisiert sind. Der Nachweis von Ak:Ag-Komplexen im Blut sowie ihre Trennung und Charakterisierung liefern wertvolle Information, die beispielsweise zur Diagnose von Krankheiten verwendet werden kann.

Zur Feststellung und quantitativen Bestimmung von Ag, Ak und Ak:Ag-Komplexen sind zahlreiche Verfahren bekannt. Dies trifft insbesondere auch für die Bestimmung der Natur und Menge des vorhandenen Ag zu. Diese quantitativen Bestimmungsverfahren werden «Immunoassays» genannt.

Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass eine natürlich vorkommende Substanz, nämlich der Rheumafaktor, im folgenden mit RF bezeichnet, die Eigenschaft hat, sich mit Ak:Ag-Komplexen zu vereinigen, jedoch nicht mit einem freien Ag oder einem freien Ak. Obwohl es bereits vorgeschlagen wurde (Agnello et al, J. Exp. Med., 134, 228 (1971), diese Eigenschaft in einer besonderen Weise zur Feststellung von Ak:Ag-Komplexen auszunützen (allerdings nicht zur quantitativen Analyse oder absoluten Bestimmung), hat man bisher nicht erkannt, das RF potentiell ein ausserordentlich nützliches Reagenz zur Analyse von Ak, Ag und Ak:Ag-Komplexen ist.

Es wurde nun überraschend herausgefunden, dass RF in unlöslich gemachter Form ein in einem sehr weiten Bereich einsetzbares Reagenz für analytische Verfahren ist, die Ak, Ag und bzw. oder Ak:Ag-Komplexe betreffen. Die Verwendung dieses Reagenzes führt zu einfacheren und genaueren Immunprüfverfahren (Immunoassays).

RF ist ein bekanntes Material, und Verfahren für seine Gewinnung und Trennung sind bekannt. Es ist im Blut einer Anzahl von Tierarten einschliesslich des Menschen vorhanden oder kann darin hervorgerufen werden. Normalerweise gewinnt man es von Ziegen oder Kaninchen durch intradermale Injektionen ihrer eigenen gereinigten Immunglobuline, die vorher durch eine zehnmünütige Wärmebehandlung bei etwa 63 °C angehäuft worden sind. RF wird dann aus dem von den Tieren gewonnenen Serum isoliert, indem man das Serum durch eine Säule von angehäuften Immunglobulinen leitet, an denen RF

zurückgehalten wird. RF kann dann aus der Säule eluiert werden, indem man als Eluierungsmittel eine Lösung mit einem geeigneten pH-Wert oder einer geeigneten Salzkonzentration verwendet.

Gegenstand der Erfindung ist das in Anspruch 1 angegebene Verfahren. Vorteilhafte Ausgestaltungen dieses Verfahrens sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Die allgemeinen Verfahrenstechnik, die beim Ausführen dieser Verfahren angewandt wird, ist dem Fachmann geläufig, so dass eine Einzelbeschreibung nicht erforderlich ist.

Bei dem erfindungsgemässen Verfahren zur Analyse einer Probe auf Ak, Ag und Ak:Ag-Komplexe wird eine Lösung von RF verwendet. Das RF verbindet sich mit den Ak:Ag-Komplexen, jedoch nicht mit den freien Ak oder dem freien Ag. Das RF ist daher wirksam, um die Ak:Ag-Komplexe herauszutrennen bzw. zu binden, um RF/Ag:Ag zu bilden.

In gewissen Fällen hat es sich gezeigt, dass bei der Bildung von RF/Ag:Ag eine Tendenz zur Agglomeratbildung besteht und dass in diesem Fall das agglomerierte RF/Ag:Ag durch Zentrifugieren oder Filterung entfernt werden kann, um eine klare Lösung zu hinterlassen. Diese Lösung enthält entweder

- a) RF, jedoch keine Ak:Ag-Komplexe, oder
- b) Ak:Ag-Komplexe, jedoch kein RF.

Dies hängt davon ab, ob ein Überschuss oder ein Mangel an RF bestand. In den Fällen, bei denen diese effiziente Entfernung von RF/Ak:Ag möglich ist, wird die quantitative Untersuchung erleichtert, da es nämlich nur noch erforderlich ist, die in der Lösung verbleibende oder die aus der Lösung entfernte Menge an RF oder Ak:Ag zu messen. Das entfernte RF/Ak:Ag kann man mit Puffern behandeln, um das Ak:Ag aus dem RF freizugeben. Die oben genannten Messungen können in einfacher Weise dadurch vorgenommen werden, dass Materialien verwendet werden, die eine Identifizierungskennung tragen, beispielsweise ein radioaktives Atom, ein Enzym, ein Koenzym oder eine Fluoreszenzgruppe. Die Verwendung solcher Kennungen ist für Ak, Ag und Ak:Ag-Komplexe bekannt, obwohl sie zuvor zur Kenntlichmachung von RF nie verwendet wurden. Die Erfindung beinhaltet folglich auch Analysierverfahren mit einer Lösung von RF, bei der RF eine Identifizierungskennung trägt.

Wenn ein Ak:Ag-Komplex (entweder am Ak oder am Ag) eine Enzymkennung trägt und das betreffende Enzym ein Substrat mit einem sehr grossen Molekulargewicht hat, wie es beispielsweise für Amylase der Fall ist, deren Substrat Stärke ist, hat es sich gezeigt, dass bei einer Bindung des Komplexes mit RF die Aktivität des Enzyms gehemmt wird. Eine derartige Enzymkennung kann entweder mit dem Ak oder dem Ag verbunden werden, und zwar entsprechend der in *Nature*, 219, 186 (1968), von Miles und Hales beschriebenen Technik. Wenn eine solche Hemmung auftritt, ist es bei den Untersuchungs- bzw. Analyseverfahren nicht mehr erforderlich, das RF/Ak:Ag aus dem Testgemisch zu entfernen, da die gesamte enzymatische Aktivität des Gemisches nur noch auf dem kenntlich gemachten Ak oder Ag beruht, das nicht an RF gebunden ist. Dies stellt eine äusserst vorteilhafte Massnahme bei der Verwendung von RF zur Immunprüfung mit enzymatischer Kennung dar. Bisher war es erforderlich, den Ak:Ag-Komplex aus dem Testgemisch zu entfernen, bevor die enzymatische Aktivität bestimmt werden konnte. Wenn RF in Verbindung mit einem geeigneten enzymatisch kenntlich gemachten Ak- oder Ag-System verwendet werden, ist es nicht mehr erforderlich, den Ak:Ag-Komplex zu entfernen. Diese Vereinfachung vereinfacht in einem hohen Masse Analysenverfahren, die auf dem kontinuierlichen Durchflussprinzip beruhen.

Lösungen von RF sind für alle Arten von Immunprüfungen nützlich. Sie können beispielsweise für Analysen auf Ak oder Ag verwendet werden, bei denen die gesamte Ak oder Ag in

einen Ak:Ag-Komplex umgesetzt werden, oder sie können für konkurrierende Bindungstests Verwendung finden. Unter diesen auf einem Wettbewerb beruhenden Bindungstests gibt es Verfahren, bei denen einem Testgemisch eine unzureichende Menge an RF zugesetzt wird, um den gesamten Ak:Ag-Komplex und den kenntlich gemachten Ak:Ag-Komplex zu binden. Die Menge des kenntlich gemachten Komplexes, der an das RF gebunden ist oder der ungebunden bleibt, wird dann bestimmt, um die in der ursprünglichen Testprobe befindliche Menge an Ak, Ag oder Ak:Ag zu ermitteln. Bei einer anderen Art von konkurrierendem Bindungstest findet der Wettbewerb bzw. die Konkurrenz zwischen beispielsweise einem kenntlich gemachten und einem nicht kenntlich gemachten Ag im Hinblick auf eine begrenzte Menge von Ak statt. Das RF wird benutzt, um den auf diese Weise gebildeten Komplex zu binden und um ihn in wirksamer Weise von dem nicht gebundenen Ag zu trennen.

Lösungen von RF sind insbesondere zur kontinuierlichen Durchflussanalyse von biologischen Fluidproben nützlich, und die Erfindung umfasst daher diese Art der Anwendung. Einige der oben erwähnten Verfahren werden im folgenden im einzelnen beschrieben.

Konkurrierender Bindungstest

Dieser Bindungstest betrifft den Wettbewerb zwischen zwei Ak:Ag-Komplexen in bezug auf eine begrenzte Menge von RF. Wenn beispielsweise ein Überschuss von einem kenntlich gemachten Ak:Ag-Komplex einer begrenzten Menge von RF zugesetzt wird, wird das gesamte RF an den Komplex gebunden. Wenn dann zusätzlich zu dem kenntlich gemachten Komplex eine Serumprobe zugefügt wird, die einen nicht kenntlich gemachten Ak:Ag-Komplex enthält, kommt es zwischen dem kenntlich gemachten und dem nicht kenntlich gemachten Komplex zu einem Wettbewerb auf einer molaren Basis in bezug auf die begrenzte Menge an RF. Wenn nach Erreichen des Gleichgewichts das RF zusammen mit den gebundenen Komplexen entfernt wird, zeigt das Vorhandensein (oder das Vorhandensein einer besonderen minimalen Menge) des kenntlich gemachten Komplexes in der verbleibenden Lösung an, dass die Serumprobe einen Ak:Ag-Komplex enthielt. Dieses Verfahren kann zur quantitativen Bestimmung eingesetzt werden, um die Menge des Komplexes in der Serumprobe zu messen, und man kann es heranziehen, um das Vorhandensein eines besonderen Ag oder Ak nachzuweisen, indem man die Gegenwart eines Ak:Ag-Komplexes nach der Zugabe des spezifischen Ag oder Ak stellt.

Bei dem obigen Verfahren kann man das an RF gebundene Ak:Ag entfernen, wenn es unlöslich ist oder anderweitig selektiv aus der Lösung entnommen werden kann. Wenn man andererseits von der enzymatischen Kennung Gebrauch macht, und es zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität bei der Bindung an RF kommt, braucht das gebundene Ak:Ag nicht mehr entfernt zu werden.

Nachweis und Analyse eines Antigens

Ein Antigen, beispielsweise Morphin, kann wie folgt nachgewiesen und analysiert werden. Morphin wird mit einem Enzym, beispielsweise Amylase, kenntlich gemacht. Spezifische Antimorphin-Antikörper Ak'' werden zubereitet. Die auf Morphin zu untersuchende Probe aus Serum oder Harn wird mit Ak'' gemischt. Irgendein vorhandenes Morphin bildet mit dem Ak'' einen Komplex. Dann wird das durch ein Enzym kenntlich gemachte Morphin zugesetzt. Dies ist lediglich in der Lage, mit dem Ak'' entsprechend der Konzentration des Morphins in dem Serum oder Harn zu komplexieren. Eine Lösung von RF wird dann zugesetzt.

Das RF verbindet sich mit den Komplexen, die zwischen dem Ak'' und dem ggf. in dem Serum vorhandenen Morphin und dem kenntlich gemachten Morphin gebildet werden. Es

entstehen Agglomerate. Das Ergebnis davon ist, dass die Komplexe aus dem Ak'' und dem kenntlich gemachten Morphin infolge ihrer Bindung ihre enzymatische Aktivität verlieren, so dass es nur noch notwendig ist, die enzymatische Aktivität des freien kenntlich gemachten Morphins in der Lösung zu messen. Wenn es erwünscht ist, kann man die agglomerierten RF/Ak'': Morphin-Komplexe aus der Lösung entfernen, obwohl dies nicht notwendig ist. Ein ähnliches Verfahren kann man für andere Antigene und mutatis mutandis Antikörper verwenden.

Dieses Verfahren veranschaulicht eine äusserst nützliche Eigenschaft, die bei der Verwendung von Lösungen von RF auftritt, dass nämlich bei einer Bindung an Ak:Ag-Komplexe, in denen der Ak oder Ag durch gewisse Enzyme kenntlich gemacht ist, eine Agglomeration auftritt, und zwar mit dem Ergebnis, dass die Aktivität des Enzyms gehemmt wird.

Allgemeines Immunprüfverfahren

Es ist oft erwünscht, dass die in einer Probenflüssigkeit vorhandene Menge eines Ak, Ag oder Ak:Ag-Komplexes gemessen wird. Es sind Verfahren (Immunprüfverfahren) bekannt, die dies ermöglichen. Es hat sich herausgestellt, dass RF für Immunprüfverfahren eingesetzt werden kann, und zwar mit grossem Vorteil sowohl im Hinblick auf die Vereinfachung des Gesamtverfahrens als auch im Hinblick auf eine höhere Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Ergebnisse.

Im folgenden wird an Hand eines allgemeinen Beispiels die Verwendung einer Lösung von RF in einem Immunprüfverfahren beschrieben. Unabhängig von diesem Beispiel kann RF mit grossem Vorteil auch in anderen Immunprüfverfahren verwendet werden.

Bei einem typischen bekannten radiometrischen Immunprüfverfahren zum Überprüfen eines Antigens Ag wird der Lösung des Ag eine bekannte Menge desselben Ag hinzugefügt, dass jedoch radioaktiv kenntlich gemacht ist und hier mit Ag* bezeichnet ist. Weiterhin wird eine bekannte Menge des spezifischen Antikörpers Ak für das Ag (und Ag*) zugesetzt. Es werden Komplexe Ak:Ag und Ak:Ag* gebildet. Diese Komplexe werden herausgetrennt, so dass eine Flüssigkeit mit Ag und Ag* verbleibt. Die Menge des Ag*, die entweder in den herausgetrennten Komplexen ist oder die in der Flüssigkeit verblieben ist, kann gemessen werden. Daraus kann man dann das ursprünglich in der Probe vorhandene Ag berechnen.

Obwohl dieses bekannte Verfahren nutzbar ist, ist seine Ausführung äusserst mühsam, da für jedes besondere, zu messende Ag (oder Ak) das radioaktiv kenntlich gemachte Ag* (oder Ak*) ermittelt werden muss.

Durch Verwenden einer Lösung von RF kann man diesen Nachteil überwinden. Der das zu bestimmende Ag enthaltenden Probe wird beispielsweise zuerst ein Überschuss des spezifischen Antikörpers Ak zugesetzt. Folglich wird ein Komplex Ak:Ag gebildet. Es wird dann eine bekannte Menge einer Lösung von RF zugesetzt, die die Menge übertrifft, die zum Binden des gesamten Ak:Ag-Komplexes notwendig ist. Das gebildete RF/Ak:Ag agglutiniert und kann entfernt werden. In der Lösung verbleibt somit der Überschuss an RF, d.h. die ursprünglich zugesetzte Menge abzüglich der an den Ak:Ag-Komplex gebundenen Menge. Die verbleibende Überschussmenge kann dann gemessen werden, so dass die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge des Ag berechnet werden kann.

Die Überschussmenge von RF kann beispielsweise derart gemessen werden, dass man kenntlich gemachtes RF verwendet oder dass das überschüssige RF einer bekannten überschüssigen Menge eines kenntlich gemachten Ag':Ak'-Komplexes zugesetzt wird, beispielsweise einem Komplex, der mit Katalase (das ist ein Antigen) und Antikatalase-Serum gebildet ist. Das RF in der Lösung bindet den kenntlich gemachten Komplex Ag', Ak', und die darin befindliche Menge RF kann dann berechnet werden, beispielsweise durch Messen der enzymatischen Aktivität

der Lösung, und zwar mit der Option, dass vorher der Komplex entfernt wird. Es kann allerdings nicht wesentlich sein, den Komplex zu entfernen, da, obwohl die Enzymkatalase in bezug auf den Ak verhältnismässig gross ist und beim Bilden des Komplexes Ak:Ag keinen Verlust an Aktivität erleidet, ein Verlust an Aktivität auftritt, wenn der Komplex mit RF gebunden wird und Agglomeration auftritt.

Es sei bemerkt, dass bei dem obigen Verfahren unter Verwendung von RF abgesehen von dem spezifischen Antikörper Ak alle Reagenzien Standardstoffe sind, d.h. das RF und der kenntlich gemachte Komplex Ak':Ag'. Diese Reagenzien können für die quantitative Analyse irgendeines Ag oder (mutatis mutandis) Ak oder eines Komplexes selbst verwendet werden. Wenn die Analyse für den Komplex selbst erfolgt, wird der oben beschriebene anfängliche Schritt, nämlich der Zusatz des Antikörpers Ak, weggelassen.

Charakterisierung

Viele der oben beschriebenen Verfahren, bei denen eine Lösung von RF verwendet wird, können zur Vorbereitung der Charakterisierung von Ak, Ag oder Ak:Ag-Komplexen benutzt werden. Einige der Verfahren führen direkt zu einer Identifikation von beispielsweise einem besonderen Ak oder Ag. Dabei handelt es sich beispielsweise um solche Verfahren, bei denen die Gegenwart eines besonderen Ak vermutet wird und dies dann auch durch Zugabe des besonderen Ag bestätigt und das Vorhandensein des Ak:Ag-Komplexes bestimmt wird.

RF ist ein zur Charakterisierung von Ak, Ag und Ak:Ag-Komplexen äusserst nützliches Reagenz. Dazu wird auf die folgenden Ausführungen verwiesen.

Die Identifikation (d.h. Charakterisierung) eines Antigens wird im allgemeinen mit verschiedenartigen Verfahren vorgenommen, beispielsweise durch Spektrofotometrie, um das Vorhandensein einer Nukleinsäure festzustellen, durch Elektronenmikroskopie, um Viren zu identifizieren, und durch Immunfluoreszenz mit spezifischen Antiseren, die gegen Virus- oder Gewebeantigene gerichtet sind. Für gewisse Anwendungen kann es zweckmässig sein, das RF (gelöst oder in nicht löslich gemachter Form) kenntlich zu machen. Dies kann beispielsweise mit J¹²⁵, einem Fluoreszenzstoff oder einem Koenzym (NADH) geschehen.

Lösungen von RF vereinigen sich nicht nur mit Ak:Ag-Komplexen, sondern auch mit angehäuften Immunglobulinen. Diese Tatsache sollte man bei der Ausführung der oben beschriebenen Verfahren im Gedächtnis behalten. Angehäufte Immunglobuline kann man beispielsweise mit radioaktivem Jod oder mit einem Fluorchrom kenntlich machen, und man kann sie bei den oben beschriebenen analytischen Verfahren anstelle der kenntlich gemachten Ak:Ag-Komplexe verwenden, beispielsweise beim Analyseverfahren anstelle des kenntlich gemachten Ak':Ag'-Komplexes.

Hemmung von Agglutination

RF verursacht Agglutination von roten Blutzellen. Ferner verursacht es die Agglutination von Stoffen, die beispielsweise einen Überzug oder eine äussere Oberfläche aus Immunglobulinen haben, wie Polystyrolteilchen, die mit Immunglobulin überzogen sind. Solche Überzüge können durch immunologische Reaktionen zwischen Ak und Membran-Antigenen gebildet werden oder durch physikalische Adsorption oder durch chemische Reaktion. Mit Immunglobulin überzogene Polystyrolteilchen sind handelsüblich, können aber auch sehr leicht selbst hergestellt werden.

Wenn diese überzogenen Teilchen oder roten Blutzellen mit RF in Berührung kommen, beginnt das Auftreten der Agglutination. Wenn allerdings in der Lösung auch ein Ak:Ag-Komplex vorhanden ist, reagiert dieser mit RF verhältnismässig schneller, so dass das RF an den in der Lösung befindlichen

Ak:Ag-Komplex gebunden wird und als Folge davon keine Agglutination der überzogenen Teilchen (oder roten Blutzellen) auftritt. Das Vorhandensein von Ak:Ag-Komplexen im Serum kann man somit beispielsweise dadurch nachweisen, dass das Serum mit (löslichem) RF sowie mit Teilchen in Berührung gebracht wird, die mit Immunglobulin überzogen sind. Wenn eine Agglutination beobachtet wird, enthält das Serum keine Ak:Ag-Komplexe.

Dies ist ein sehr einfacher und zuverlässiger Test, der zum Nachweis von allen Ak:Ag-Komplexen angewendet werden kann. Es folgt ein Beispiel des Verfahrens:

50 µl Serum werden 50 µl einer Lösung von löslichem RF zugesetzt, und das Gemisch wird mit 50 µl einer Suspension von Polystyrol-Teilchen vereinigt, die mit Immunglobulinen überzogen sind. Eine auftretende Agglutination der Teilchen kann sehr leicht festgestellt werden.

Der beschriebene Test kann auch zum Nachweis der Anwesenheit eines besonderen Ag oder Ak im Serum benutzt werden. Wenn man beispielsweise eine Überprüfung auf ein besonderes Antigen Ag' vornehmen will, wird dem Serum der geeignete spezifische Antikörper Ak' zugesetzt, und dann wird der Test auf das Vorhandensein eines Ak:Ag-Komplexes, nämlich Ak':Ag', durchgeführt. Wenn das Serum ursprünglich andere Ak:Ag-Komplexe enthält, müssen diese zuerst entfernt werden, beispielsweise durch Verwendung von unlöslich gemachten RF oder C1q, wie es in einer gleichzeitig eingereichten Anmeldung der Anmelderin beschrieben ist, auf die hiermit Bezug genommen wird.

Zum besseren Verständnis der Erfindung werden im folgenden Ausführungsbeispiele erläutert.

Beispiel 1

Bestimmung von Thyroxin (T_4)

400 µl einer Probe mit T_4 wurden 100 ml einer Lösung mit 60 ng RF und 1,00 ml Kaninchen-Antihuman- T_4 -Serum zugesetzt, das in geeigneter Weise verdünnt worden ist. Das Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert und anschliessend für 5 min. bei 3000 g zentrifugiert. Das Obenstehende wurde mit einer Pasteur-Pipette entfernt und in ein Röhrchen gegeben, das 25 µl aminierte Agarose (AH-Sephrose) enthielt, mit dem zuvor angehäuften IgG kovalent verbunden worden ist. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur für 15 min. inkubiert und dann zentrifugiert, um die Agaroseteilchen zusammenzupacken. Das Obenstehende wurde entfernt, und der Rest wurde mit 1 ml einer 0,5-n wässrigen Ammoniumrhodanidlösung geschüttelt. Das Obenstehende wurde dann quantitativ nach einem üblichen Verfahren auf IgM analysiert.

Die Konzentration des T_4 war der endgültigen Konzentration des verbleibenden IgM oder Rf umgekehrt proportional.

Beispiel 2

Bestimmung von IgE

0,1 ml der zu untersuchenden Probe wurde mit einer Pipette in ein 5-ml-Zentrifugenrohr gegeben, und 1,0 ml Kaninchen-Antihuman-IgE-Antiserum (verdünnt 1:128) sowie 0,1 ml von handelsüblichen J^{125} IgE (60 000 Zählungen/min.) zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert, und anschliessend wurden 0,1 ml einer RF-Lösung mit 100 ng RF zugesetzt. Die Inkubation wurde für eine weitere Stunde fortgesetzt, und das Gemisch wurde dann bei 2000 UpM für 5 min. zentrifugiert.

Das Obenstehende wurde entfernt, und die Radioaktivität wurde mit einem Gammzähler gemessen. Die Konzentration des IgE war umgekehrt abhängig von der radioaktiven Zählung und konnte an Hand einer zuvor aufgenommenen Eichkurve ermittelt werden.

Beispiel 3

Bestimmung von IgE

0,1 ml einer Probe mit IgE wurde mit einer Pipette in ein 5-ml-Rohr gegeben, und es wurde 1,0 ml des Kaninchen-Antihuman-IgE-Antiserums (verdünnt 1:128) zugesetzt. Das Gemisch wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde 1 ml einer Lösung zugegeben, die 60 000 Latexteilchen mit einem Durchmesser von 0,8 µ enthielt. Die Teilchen wurden zuvor in einer physiologischen Salzlösung mit 1 mg IgG/ml inkubiert. Das Gemisch wurde geschüttelt, und es wurde 0,1 ml einer Lösung mit 600 ng RF zugesetzt.

Das Gemisch wurde über Nacht inkubiert und dann in einem Teilchenzähler verarbeitet, der Teilchen, die einen Durchmesser von mehr als 1 Mikron haben, nicht berücksichtigt. Die Konzentration des IgE war dem Teilchenzählwert umgekehrt proportional und konnte an Hand einer zuvor aufgenommenen Eichkurve ermittelt werden, die man mit Lösungen erhalten hatte, die bekannte Konzentrationen von IgE enthielten.

Beispiel 4

Automatische Analyse auf α_1 -Fetusprotein

Eine zu untersuchende Probe wird mit einem Durchfluss von 0,1 ml/min. in ein automatisches, nach dem kontinuierlichen Durchflussprinzip arbeitendes Analysengerät gepumpt, und zwar zusammen mit einer denselben Durchfluss aufweisenden Lösung mit 60 000 Latexteilchen/ml. Die Latexteilchen hatten einen Durchmesser von 0,8 Mikron, und die Lösung war zuvor mit einem α_1 -Fetusprotein-Antiserum inkubiert worden, das mit einer physiologischen Salzlösung 1:64 verdünnt worden war. Die gemischten Ströme wurden mit Luft segmentiert, die mit einem Durchfluss von 0,32 ml/min. in das System gepumpt wurde. Nach der Zufuhr der Luft wurde eine Lösung von RF mit einem Durchfluss von 0,4 ml/min. eingeführt.

Der luftsegmentierte Strom wurde für 10 min. bei 37 °C wärmebehandelt und anschliessend für 2 min. auf 63 °C erhitzt, um das RF zu zerstören und damit alle durch RF gebundenen Latexteilchen freizugeben. Dies betrifft allerdings nicht diejenigen, die durch Ag:Ak gebunden sind.

Der Strom wurde dann durch einen Teilchenzähler geleitet, der Teilchen unberücksichtigt liess, die einen Durchmesser von mehr als 1 Mikron hatten. Die Konzentration des α_1 -Fetusproteins war umgekehrt proportional dem Teilchenzählwert und konnte an Hand von zuvor aufgenommenen Eichkurven ermittelt werden, die mit Lösungen mit bekannten Konzentrationen von α_1 -Fetusprotein erstellt worden waren.

Beispiel 5

Bestimmung von Tetanusantoxin-Ag:Ag-Komplexen

100 µl einer Lösung mit 400 ng RF wurden 100 ml eines Serums zugesetzt, von dem man annahm, dass es Tetanusantoxin-Antigen enthalten würde. Das Gemisch wurde für 1/2 h bei Zimmertemperatur geschüttelt und dann bei 2000 g für 5 min. zentrifugiert. Das Überstehende wurde entfernt, und das restliche RF wurde mit aminierter Agarose bestimmt, wie es im Beispiel 1 beschrieben ist.

Beispiel 6

Herstellung von kenntlich gemachtem RF

200 ml von 50-mmolarem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 wurden 100 µg RF zugegeben.

Das Gemisch wurde in 20-µl-Aliquote aufgeteilt, und jedem Aliquot wurden 10 µCi J^{125} gefolgt von 50 µg Chloramin-T zugegeben. Für 30 s wurde ein Fortschreiten der Oxydation zugelassen. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 50 µl einer wässrigen Natriummetabisulfidlösung mit 50 µg Salz unterbrochen.

Das kenntlich gemachte RF wurde dann von dem J^{125} getrennt, indem das oben beschriebene Gemisch durch eine Säule aus Sephadex G25 geleitet wurde und das gewünschte kenntlich gemachte Material mit dem oben angegebenen Phosphatpuffer

ausgewaschen wurde. Die Eluatfraktionen wurden auf Gammaaktivität überprüft, und die Fraktionen mit einer Spitzenaktivität wurden zusammengebracht, verschlossen und bis zur Verwendung eingefroren.