



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>: G 01 N 33/54

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



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

**630 465**

⑳ Gesuchsnummer: 9188/80

⑥② Teilgesuch von: 6459/75

②② Anmeldungsdatum: 20.05.1975

③⑩ Priorität(en): 20.05.1974 GB 22377/74

②④ Patent erteilt: 15.06.1982

④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.06.1982

⑦③ Inhaber:  
Technicon Instruments Corporation,  
Tarrytown/NY (US)

⑦② Erfinder:  
Pierre Lucien Masson, Brüssel (BE)  
Joseph Felix Heremans, Leuven (BE)

⑦④ Vertreter:  
Patentanwälte Georg Römpler und Aldo Römpler,  
Heiden

⑤④ **Verfahren zum Nachweis oder zur Bestimmung eines Antikörper/Antigen-Komplexes in einer Fluidprobe.**

⑤⑦ Proben aus Fluiden, wie beispielsweise Serum, werden auf Antikörper/Antigen-Komplexe analysiert, indem man die Probe mit einer C1q-Lösung sowie einem Material versetzt, das bei Kontakten mit C1q zur Agglutinerung veranlasst wird. Anschliessend wird das Ausmass der Agglutinerung oder Nichtagglutinerung des Materials bestimmt.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Nachweis oder zur Bestimmung eines Ak:Ag-Komplexes in einer Fluidprobe, wobei der Probe eine Lösung von C1q zugesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, dass ausserdem ein Material zugesetzt wird, das bei Kontakt mit C1q zur Agglutinierung veranlasst wird, und dass das Ausmass der Agglutinierung oder Nichtagglutinierung des Materials bestimmt wird.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als zuzusetzendes Material ein solches verwendet, das ein Immunglobulin enthält.

3. Verfahren gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als zuzusetzendes Material ein solches verwendet, das aus inerten Trägerteilchen mit einer Immunglobulin-Beschichtung besteht.

4. Verfahren gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als inerte Trägerteilchen solche aus Polystyrol verwendet.

5. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung quantitativ erfolgt und dass als Material eine bekannte Menge von mit IgG überzogenen Latexteilchen verwendet wird, wodurch C1q an jeglichen vorhandenen Ak:Ag-Komplex gebunden wird und restliches C1q eine Agglutinierung der Latexteilchen bewirkt, und dass die Menge des restlichen C1q (und daraus die Menge an Ak:Ag-Komplex) bestimmt wird, indem die agglutinierten oder nichtagglutinierten Latexteilchen gezählt werden, und das Ergebnis mit Standardergebnissen verglichen wird.

6. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man die Bestimmung quantitativ durchführt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Prinzip des kontinuierlichen Durchflusses durchgeführt wird.

8. Anwendung des Verfahrens gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man den Komplex sich dadurch bilden lässt, dass man einem Fluid, das ursprünglich einen Ak oder ein Ag enthält, das entsprechende Ag bzw. den entsprechenden Ak zusetzt und dadurch die Menge des ursprünglich in dem Fluid vorhandenen Ak oder Ag bestimmen kann.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis oder zur Bestimmung eines Ak:Ag-Komplexes in einer Fluidprobe, beispielsweise von Harn oder Serum.

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. So sind beispielsweise viele Krankheiten durch die Anwesenheit von Ak:Ag-Komplexen im Kreislauf gekennzeichnet. Bei dem Ag kann es sich um eine grosse Vielzahl von Proteinen handeln, und zwar einschliesslich solcher Proteine, die auf die Gegenwart von Bakterien oder Viren zurückzuführen sind, oder solcher, die von menschlichen Geweben oder Krebszellen freigesetzt werden. 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 werden. Der Nachweis von Ak:Ag-Komplexen im Blut sowie ihre Abtrennung und Charakterisierung liefern wertvolle Informationen, die beispielsweise zur Diagnose von Krankheiten verwendet werden können.

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 die natürlich vorkommende Substanz C1q die Eigenschaft besitzt, sich mit Ak:Ag-Komplexen zu vereinigen, jedoch nicht mit einem freien Ag oder einem freien Ak. Obwohl es bereits vorgeschlagen wurden (Agnello et al, J. Exp. Med., 134, 228, (1971)), diese Eigenschaft in einer besonderen Weise zur Feststellung, jedoch nicht zur quantitativen Analyse oder absoluten Bestimmung von Ak:Ag-Komplexen auszunützen, hat man bisher nicht erkannt, dass C1q potentiell ein ausserordentlich nützliches Reagenz zur Analyse von Ak, Ag und Ak:Ag-Komplexen ist.

Es wurde nun ein Immunoassay-Verfahren unter Verwendung von C1q gefunden.

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

C1q ist ein natürlich umlaufendes Protein, und Verfahren zu seiner Abtrennung und Reinigung sind bekannt. Man gewinnt es im allgemeinen aus dem Serum des Menschen, Kaninchens oder Rindes, und zwar durch ein Verfahren, das als Euglobulinausfällung bekannt und beispielsweise in J. Immunol. 106, 304-413 (1971) beschrieben ist.

Der zu analysierende Ak:Ag-Komplex kann dadurch gebildet werden, dass man ein Fluid, das ein Ak oder ein Ag enthält, das entsprechende Ag bzw. den entsprechenden Ak zusetzt. Auf diese Weise ist es möglich, die Menge an Ak oder Ag in einem Fluid zu bestimmen.

Bei dem erfindungsgemässen Verfahren kann das Material, das agglutinieren gelassen wird, in weiten Grenzen variieren. So verursacht beispielsweise C1q die Agglutinierung von roten Blutkörperchen. Ferner verursacht es die Agglutination von Stoffen, die beispielsweise einen Überzug oder eine äussere Oberfläche aus Immunglobulinen besitzen, wie beispielsweise Polystyrolteilchen, die mit Immunglobulin überzogen sind. Derartige Überzüge können durch immunologische Reaktionen zwischen Ak und Membran-Antigenen, durch physikalische Adsorption oder durch chemische Reaktion gebildet werden. Mit Immunglobulin überzogene Polystyrolteilchen sind handelsüblich, können aber auch sehr leicht selbst hergestellt werden.

Wenn diese überzogenen Teilchen oder roten Blutkörperchen mit C1q in Berührung kommen, beginnt das Auftreten der Agglutination. Wenn allerdings in der Lösung auch ein Ak:Ag-Komplex vorhanden ist, reagiert dieser mit C1q verhältnismässig schneller, so dass das C1q an den in der Lösung befindlichen Ak:Ag-Komplex gebunden wird und als Folge davon keine Agglutination der überzogenen Teilchen (oder roten Blutkörperchen) auftritt. Das Vorhandensein von Ak:Ag-Komplexen im Serum kann man somit beispielsweise dadurch nachweisen, dass das Serum mit C1q 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 angewandt werden kann. Es folgt ein Beispiel für das Verfahren.

50 µl Serum werden 50 µl einer Lösung von löslichem C1q zugesetzt, und das Gemisch wird mit 50 µl einer Suspension aus Polystyrolteilchen 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 angewandt 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 gemachtem RF oder C1q, wie es in einer gleichzeitig eingereichten Anmeldung der Anmelderin beschrieben ist, auf die hiermit Bezug genommen wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch quantitativ durchgeführt werden. Beispielsweise kann die zu analysierende Probe mit einer Lösung aus C1q sowie einer bekannten Menge von mit IgG überzogenen Latexteilchen vermischt werden, wodurch C1q an jeglichen vorhandenen Ak:Ag-Komplex gebunden wird und das restliche C1q eine Agglutinierung der Latexteilchen bewirkt. Die Menge des restlichen C1q kann bestimmt werden, indem man die agglutinierten oder nichtagglutinierten Latexteilchen zählt und die Ergebnisse mit Standardergebnissen vergleicht. Aus dem dabei erhaltenen Ergebnis kann die Menge an Ak:Ag-Komplex bestimmt werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

#### Beispiel 1

##### 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 eine Stunde lang bei 37 °C bebrütet und mit 1 ml einer Lösung versetzt, die 60000 Latexteilchen mit einem Durchmesser von 0,8 µm enthielt, die zuvor in einer physiologischen Kochsalzlösung mit 1 mg IgG/ml bebrütet worden war. Das Gemisch wurde geschüttelt und mit 0,1 ml einer Lösung aus 600 Nanogramm C1q versetzt.

Das Gemisch wurde über Nacht bebrütet und dann in einem Teilchenzähler verarbeitet, der Teilchen, die einen Durchmes-

ser von mehr als 1 µm aufweisen, nicht berücksichtigt. Die Konzentration des IgE war dem Teilchenwert umgekehrt proportional und konnte an Hand einer zuvor aufgenommenen Eichkurve ermittelt werden, die man mit Lösungen erhalten hatte, die bekannt der Konzentrationen von IgE enthielten.

#### Beispiel 2

##### Automatische Analyse auf $\alpha_1$ -Fetusprotein

Eine zu untersuchende Probe wird mit einem Durchfluss von 0,1 ml/min. in ein automatisches, nach dem Prinzip des kontinuierlichen Durchflusses arbeitendes Analysengerät gepumpt, und zwar zusammen mit einer denselben Durchfluss aufweisenden Lösung, die 60000 Latexteilchen/ml enthielt. Die Latexteilchen hatten einen Durchmesser von 0,8 µm, und die Lösung war zuvor mit einem  $\alpha_1$ -Fetusprotein-Antiserum bebrütet worden, das mit einer physiologischen Kochsalzlösung im Verhältnis 1:64 verdünnt worden war. Die vermischten 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 C1q-Lösung mit einem Durchfluss von 0,4 ml/min. eingeführt.

Der luftsegmentierte Strom wurde 10 Minuten lang bei 37 °C wärmebehandelt und anschliessend 2 Minuten auf 63 °C erhitzt, um das C1q zu zerstören und damit alle durch C1q gebundenen Latexteilchen freizugeben. Dies betrifft allerdings nicht diejenigen, die durch Ag:Ak gebunden waren.

Der Strom wurde dann durch einen Teilchenzähler geleitet, der Teilchen unberücksichtigt liess, die einen Durchmesser von mehr als 1 µm hatten. Die Konzentration des  $\alpha_1$ -Fetusproteins war umgekehrt proportional dem Teilchenzählwert und konnte an Hand von zuvor aufgenommenen Eichkurven ermittelt werden, die mit Lösungen von bekannter Konzentration an  $\alpha_1$ -Fetusprotein erstellt worden waren.