


Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11)

645 727

| | |
|--|--|
| (21) Gesuchsnummer: 7768/79 | (73) Inhaber: Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Chuo-ku/Tokyo (JP) |
| (22) Anmeldungsdatum: 27.08.1979 | |
| (30) Priorität(en): 28.08.1978 JP 53-103890 | (72) Erfinder: Tomiyama, Tetsuo, Nerima-ku/Tokyo (JP) Ogura, Takashi, Higashiyamato-shi/Tokyo (JP) |
| (24) Patent erteilt: 15.10.1984 | |
| (45) Patentschrift veröffentlicht: 15.10.1984 | (74) Vertreter: Bovard AG, Bern 25 |

(54) Präparat zur Bestimmung von menschlichem beta-2-Mikroglobulin, Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung.

(57) Das Präparat zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin besteht aus Latexpartikeln eines synthetischen Polymeren, vorzugsweise eines Polystyrolpolymeren oder Copolymeren, überzogen mit einem β_2 -Mikroglobulinantikörper. Das Präparat ist geeignet zur qualitativen und quantitativen Bestimmung im menschlichen Urin oder Serum. Es werden in kurzer Zeit zuverlässige, gute reproduzierbare Ergebnisse in hoher Genauigkeit erhalten, die nicht durch andere Proteine beeinträchtigt werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Präparat zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin aus Partikeln von synthetischem polymerem Latex mit einem Überzug von menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper.

2. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,01–10 μm haben.

3. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Latexpartikel ein spezifisches Gewicht von 0,9–1,4 haben.

4. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie ausserdem als Stabilisator eine Aminosäure oder Dextran enthalten.

5. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Latexpartikel solche vom Styroltypus sind, ausgewählt aus der Gruppe von Styrolpolymeren, Styrolcopolymeren und carboxylierten oder Aminogruppen enthaltenden carboxylierten Derivaten derselben.

6. Präparat nach einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, dass es in Form eines Latex vorliegt.

7. Präparat nach einem der Ansprüche 1–6, dadurch gekennzeichnet, dass es in Form eines getrockneten Latex vorliegt.

8. Verfahren zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin, dadurch gekennzeichnet, dass in menschlichem Urin oder Serum eine qualitative oder quantitative Bestimmung vorgenommen wird unter Verwendung eines Präparats aus Partikeln von polymerem synthetischem Latex mit einem Überzug von β_2 -Mikroglobulinantikörper.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung nach der Mikrotitermethode durchgeführt wird.

10. Verfahren zur Herstellung eines Präparats zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin aus Partikeln von synthetischem polymerem Latex mit einem Überzug von menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper, dadurch gekennzeichnet, dass ein polymerer synthetischer Latex in einer Konzentration von 0,05–5% in Kontakt gebracht wird mit einem menschlichen β_2 -Mikroglobulinantikörper in einer Konzentration von 0,0001–1% in einem Puffer bei einem pH von 5–10 und bei einer Temperatur von 4–40°C.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Präparat zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin, einem Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung. Das Präparat ist geeignet für eine qualitative und quantitative Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin, hat eine verbesserte Lagerfähigkeit und ergibt schnelle zuverlässige Ergebnisse, die gut reproduzierbar sind und eine hohe Genauigkeit aufweisen, ohne dass sie durch andere Proteine, die in der Probe enthalten sind, beeinträchtigt werden, und wobei ein einfaches Messverfahren und ein einfaches Messinstrument verwendet wird.

Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf ein Präparat zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin aus Partikeln von synthetischem polymerem Latex mit einem Überzug von menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper. Vorzugsweise bestehen die Partikel aus einem Latex eines synthetischen Polymeren vom Styroltyp ausgewählt aus der Gruppe Styrolpolymer, Styrolcopolymer und carboxylierte oder Aminogruppen enthaltende carboxylierte Derivate derselben.

Menschliches β_2 -Mikroglobulin ist ein Protein, das ein relativ niedriges Molekulargewicht von etwa 12000 hat und das sich im Serum, Urin, cerebrospinalen Flüssigkeiten,

Saliva, Milch usw. des Menschen findet. Die In-vivo-Funktion von β_2 -Mikroglobulin ist noch nicht völlig aufgeklärt worden. Kürzlich wurde jedoch festgestellt, dass bei bestimmten Erkrankungen, wie Entzündungen, Krebs und renalen Erkrankungen, sich der β_2 -Mikroglobulingehalt in den Flüssigkeiten des menschlichen Körpers erhöht. Beispielsweise werden renale Erkrankungen klassifiziert in solche, die verursacht werden durch glomerulare Unstimmigkeiten und solche durch Erkrankungen der renalen Tubuli. Bei dem letztgenannten Fall erhöht sich der β_2 -Mikroglobulingehalt zuerst im Blut, d.h. im Serum und dann im Urin.

Das β_2 -Mikroglobulin ist ein Protein, das die glomerulare Membrane durchdringt und dann reabsorbiert wird von den renalen Tubuli. Wenn jedoch eine Erkrankung der renalen Tubuli vorliegt, geht das Protein in den Urin über, ohne reabsorbiert zu werden. Daher ist der Gehalt an β_2 -Mikroglobulin im Urin eine der besten Parameter für die Funktion der renalen Tubuli. Daher kann eine Unstimmigkeit der renalen Tubuli diagnostifiziert werden durch Bestimmung des Gehalts an β_2 -Mikroglobulin in Serum und Urin.

Bis heute ist kein geeignetes Verfahren bekannt zur Beurteilung von Unstimmigkeiten bei den renalen Tubuli. Es ist jedoch eine leichte Diagnose möglich durch Messen des β_2 -Mikroglobulingehalts im Serum und im Urin, wodurch ein geeigneter Weg zur Behandlung der Erkrankung geschaffen wird. Dieser ist sehr wichtig und geeignet für klinische Anwendung.

Ein Verfahren zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin im Serum oder Urin mit hoher Genauigkeit und Zuverlässigkeit entspricht einem dringenden Bedürfnis. Jedoch ist keines der konventionellen Verfahren zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin befriedigend. Eines der bekannten Verfahren ist ein «Einzelradialimmundiffusion»-Verfahren bei dem auf einer Agarplatte, die menschlichen β_2 -Mikroglobulinantikörper enthält, Vertiefungen vorgesehen sind, in die die Probe eingebracht wird und wobei das menschliche β_2 -Mikroglobulin bestimmt wird durch eine Ausfällungsbande, die durch Diffusion des β_2 -Mikroglobulins entsteht. Da dieses Verfahren eine niedrige Empfindlichkeit hat, kann es nur verwendet werden zur Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin in Proben innerhalb einer gewissen Konzentrationsgrenze.

Es ist ferner eine Radioimmunoassayverfahren bekannt, bei dem β_2 -Mikroglobulin bestimmt wird durch Verwendung eines menschlichen β_2 -Mikroglobulinantikörpers, der mit einem Radioisotop markiert ist. Dieses Verfahren ist gefährlich und beschwerlich, da mit radioaktiven Substanzen gearbeitet werden muss. Daher kann es nur durchgeführt werden mit ausreichenden Kontrollen und einer Einrichtung zur Verwendung von radioaktiven Substanzen.

Bei einem weiteren Verfahren wird eine umgekehrte passive Hemagglutinationsreaktion (RPHA) verwendet zur Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin, die hinsichtlich der Empfindlichkeit gleich ist dem Radioimmunoassayverfahren. Da bei diesem Verfahren rote Blutzellen von Tieren als Träger verwendet werden, hat sie den Nachteil, dass bei der Herstellung von Antikörper sensibilisierten roten Blutzellen eine Vorbehandlung der roten Blutzellen wie Fixierung der roten Blutzellen und Behandlung der roten Blutzellen mit Bindemitteln wie Glutaraldehyd oder Tanninsäure notwendig sind. Da bei den tatsächlichen Messungen bei den als Antikörper für die roten Blutzellen verwendeten Träger nicht spezifische Reaktionen auftreten, ist es notwendig, eine Absorptionsbehandlung mit den roten Blutzellen durchzuführen sowie ein Kontrollverfahren unter Verwendung von Zellen, die mit Tanninsäure behandelt sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die vorstehend genannten Nachteile zu vermeiden und ein Verfahren zur

Bestimmung von menschlichen β_2 -Mikroglobulin unter Verwendung einer einfachen Vorrichtung und einer einfachen Messoperation, bei der zuverlässige Ergebnisse mit hoher Genauigkeit erhalten werden, zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind das im Anspruch 1 definierte Präparat, das im Anspruch 8 beschriebene Verfahren zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin und das im Anspruch 10 beschriebene Verfahren zur Herstellung des Präparates.

Das genannte erfindungsgemässe Präparat hat ferner eine überlegene Lagerbeständigkeit und die Messung wird nicht beeinträchtigt durch andere Proteine, die in der Probe enthalten sein können. Wie ferner gefunden wurde, kann das genannte Präparat einfach hergestellt werden und nicht nur in Form eines Latex, sondern auch als Trockenprodukt gelagert werden.

Menschliches β_2 -Mikroglobulin ist vorhanden in verschiedenen menschlichen Körperflüssigkeiten wie Urin, Milch, Serum usw. und kann verwendet werden als Ausgangsprodukt zur Herstellung des erfindungsgemässen Präparates. Vorteilhafterweise wird das Ausgangsprodukt hergestellt aus dem Urin des Patienten, der von den oben erwähnten Erkrankungen befallen ist. Die Abtrennung des menschlichen β_2 -Mikroglobulins kann unter Verwendung von verschiedenen an sich bekannten Verfahren durchgeführt werden. Beispiele für derartige Verfahren sind die elektrophoretische Zonenmethode, das Verfahren von Berggård und Mitarb. (I. Berggård und Mitarb., J. Biol. Chem. 243, 4095, 1968) durch Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und das Verfahren von Ohsawa und Mitarb. (M. Ohsawa und Mitarb., Experientia 29, 1179, 1973).

Das als Ausgangsprodukt verwendete menschliche β_2 -Mikroglobulin ist vorzugsweise ein einziges Protein, da der Einschluss von Verunreinigungen die nachfolgende Operation kompliziert.

Antikörper, die unter Verwendung des menschlichen β_2 -Mikroglobulins unter Anwendung der vorgenannten bekannten Verfahren erhalten werden können, können hergestellt werden durch Verabreichung des β_2 -Mikroglobulins als Antigen an Tiere, die eine hohe Antikörperproduktion aufweisen, wie Meerschweinchen, Kaninchen oder Ziegen, wobei in üblicher Weise eine Immunisierung erfolgt, das Blut des immunisierten Tiers abgenommen wird und der menschlichen β_2 -Mikroglobulinantikörper aus dem erhaltenen Blut abgetrennt wird.

Bei diesem Verfahren kann ein beliebiges Tier verwendet werden, das die Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern besitzt. Um jedoch eine grosse Menge an Antikörper zu erhalten, ist die Verwendung von grossen Tieren bevorzugt. Im allgemeinen werden Kaninchen oder Ziegen bevorzugt, das Verfahren ist jedoch hierauf nicht beschränkt. Die Abtrennung des menschlichen β_2 -Mikroglobulinantikörpers aus dem Antiserum kann durchgeführt werden mittels bekannter Verfahren, zum Beispiel wird das Antiserum ausgesalzen und eine Adsorption-Eluierung unter Verwendung eines unlöslichen Antigens wird wiederholt durchgeführt.

Für das erfindungsgemässe Präparat können verschiedene synthetische Latexpartikel verwendet werden, z.B. Polymere oder Copolymere, die einen solchen Latex bilden, z.B. Polystyrol, carboxyliertes Polystyrol, Aminogruppen enthaltendes carboxyliertes Polystyrol, Polyvinyltoluol, Styrol-Butadiencopolymer, carboxyliertes Styrol-Butadiencopolymer, Styrol-Divinylbenzolcopolymer, Vinyltoluol-tert-Butylstyrolcopolymer, Polyester, Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure, Polyacrylonitril, Acrylnitril-Butadien-Styrolcopolymer, Polyvinylacetat-acrylat, Polyvinylpyrrolidon und Vinylchlorid-acrylatcopolymer.

Bevorzugt werden Partikel aus einem Latex eines Polyme-

ren vom Styroltypus, ausgewählt aus der Gruppe von Styrolpolymer, Styrolcopolymer, wie ein Copolymeres von Styrol mit beispielsweise Chlorstyrol, Methylmethacrylat und Vinylidenchlorid, und carboxylierten oder Aminogruppen enthaltenden carboxylierten Derivaten derselben. Diese Partikel aus synthetischem polymerem Latex können verwendet werden nach einer Vorbehandlung der Oberfläche mit einem nicht-ionogenen oberflächenaktiven Mittel. Vorzugsweise wird ein nichtionogenes oberflächenaktives Mittel vom Typus Äthylenoxid auf der Oberfläche dieser Partikel adsorbiert nach dem Verfahren, das beschrieben ist in der offengelegten japanischen Patentanmeldung Nr. 9716/76 (26. Januar 1976). Beispiele von geeigneten nichtionogenen oberflächenaktiven Mitteln vom Äthylenoxidtyp sind Blockcopolymere von Äthylenoxid und Polyoxypropylenglykol, Polyoxyäthylenalkyläther und Polyoxyäthylenalkylaryläther.

Die erfindungsgemässen Latexpartikel haben vorzugsweise einen durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 0,1–10, insbesondere 0,1–1 μm . Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu erhöhen, wird es bevorzugt Partikel zu verwenden, die hinsichtlich ihrer Teilchengrösse in einem relativ engen Bereiche liegen. Das spezifische Gewicht der Latexpartikel beträgt vorzugsweise 0,9–1,4, insbesondere 1,1–1,3 μm . Bei einer Messung unter Verwendung einer Agglutinationsreaktion auf einer gleitenden Glasplatte können Latexpartikel verwendet werden, deren spezifisches Gewicht in einem weiten Bereich liegt. Bei Anwendung der Mikrotitermethode werden vorzugsweise Latexpartikel verwendet, die ein spezifisches Gewicht von mindestens 1,1 haben.

Das erfindungsgemässe Präparat zur Bestimmung des menschlichen β_2 -Mikroglobulins kann in einfacher Weise hergestellt werden. Erfindungsgemäss wird ein synthetischer polymerer Latex in einer Konzentration von 0,05–5% mit menschlichen β_2 -Mikroglobulinantikörper in einer Konzentration von 0,0001–1% in einem Puffer in einem pH-Bereich von 5–10, insbesondere 6,5–8 μm bei einer Temperatur von 4–40°C zusammen gebracht werden. Die Vereinigung der Komponenten kann beispielsweise durchgeführt werden durch mässiges Rühren während 30 min bis etwa 24 h.

Der Puffer kann beispielsweise eine phosphatgepufferte Salzlösung (M/60 Phosphatpuffer pH 7,2) sein, enthaltend 0,15 M NaCl (abgekürzt als PBS) und eine Glycin-gepufferte Salzlösung. Um eine nicht spezifische Agglutination zu verhindern, kann gewünschtenfalls 0,01–0,1% eines Proteins zu einer Antikörperlösung zugefügt werden. Nach dem Überziehen der Partikel werden diese mehrere Male gewaschen durch Zentrifugieren in einer neutralen Salzlösung wie in einer Glycin-gepufferten Salzlösung oder PBS. Schliesslich können die mit dem β_2 -Mikroglobulinantikörper überzogenen Partikeln in Form einer Suspension in einem Verdünnungsmittel aufbewahrt werden. Das Verdünnungsmittel ist vorzugsweise eine Mischung, die erhalten wird durch Zugabe von 0,1% BSA zu einer gepufferten Salzlösung oder zu PBS. Bevorzugt wird ferner zu dem Verdünnungsmittel 0,01–0,5% Natriumazid (NaN_3) zugegeben.

Das erfindungsgemässe Präparat zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin kann, wie vorstehend beschrieben, in Form eines Latex vorliegen, jedoch auch in Form eines getrockneten Produktes. Das Trockenprodukt kann erhalten werden durch Zugabe eines Stabilisators wie einer Aminosäure (z.B. Glycin oder Natriumglutamat) oder Dextran zu dem oben genannten Verdünnungsmittel, Suspensionen des mit menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper überzogenen Latex in dem Verdünnungsmittel und Lyophilisieren der Suspension. Die anzufindenden Mengen der Aminosäure und des Dextrans liegen bei etwa 1,2–4 Gewichtsteilen bzw. 1,6–6 Gewichtsteilen pro Gewichtsteil der Latexpartikel.

Das erfindungsgemässe Präparat zur Bestimmung des menschlichen β_2 -Mikroglobulins hat sowohl in Form eines Latex als auch als Trockenprodukt eine gute Stabilität. Das Trockenprodukt kann über längere Zeit räumegelagert werden, beispielsweise mehrere Jahre.

Gemäss der Erfindung wird ferner ein Verfahren vorgeschlagen zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin, wobei dieses qualitativ oder quantitativ bestimmt wird im menschlichen Urin oder Serum unter Verwendung des vorgenannten erfindungsgemässen Präparats.

Für die Bestimmung können an sich bekannte Verfahren angewandt werden, beispielsweise die Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin im Serum oder Urin nach dem Mikrotiterverfahren. Gemäss diesem Verfahren wird eine bestimmte Menge eines Verdünnungsmittels wie dies vorstehend erwähnt wurde, portionsweise auf eine Mikroplatte gegeben und dann eine bestimmte Menge der zu untersuchenden Probe wie Serum oder Urin in die Vertiefung der Platte gegeben, und aufeinander folgend mit einem Verdünnungsmittel behandelt. Andererseits kann eine Verdünnungsserie in derselben Weise hergestellt werden unter Verwendung eines Standardantigens. Dann wird eine bestimmte Menge eines mit menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper sensitiviertes Latex zugefügt und gemischt. Nachdem eine gewisse Zeit bei Zimmertemperatur stehengelassen wurde, wird der Endpunkt der Agglutination festgestellt und die absolute Menge des β_2 -Mikroglobulins kann bestimmt werden durch Vergleich mit der Reihe des Standardantigens.

Bei dem bekannten «Einzelradialimmunodiffusions»-Verfahren zur Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin kann die Menge des β_2 -Mikroglobulins nur bestimmt werden, wenn sie mindestens 5 μg pro ml in der Probe beträgt, wenn die Probe Serum oder Urin ist. Da bei einem β_2 -Mikroglobulingehalt von etwa 5–10 μg Irrtümer nicht auszuschliessen sind, ist eine etwas höhere Konzentration zu bevorzugen. Im Gegensatz hierzu kann nach dem erfindungsgemässen Verfahren zur Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin unter Verwendung des erfindungsgemässen Präparats durchgeführt werden, wenn die Menge des β_2 -Mikroglobulins mehr als 1 μg pro ml beträgt. Das Verfahren besitzt daher eine hohe Empfindlichkeit, die gleich oder höher ist als diejenige des Radioimmunoassayverfahrens, die bei üblichen Analysen als diejenige mit der höchsten Empfindlichkeit angesehen wird.

Nach einer anderen Ausführungsform der Messung gemäss der Erfindung wird eine gewisse Menge einer Probe auf eine gleitende Glasplatte getropft und ungetrennt eine bestimmte Menge einer Lösung eines menschlichen β_2 -Mikroglobulins bekannter Konzentration tropfenweise zugefügt. Eine bestimmte Menge des mit menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper sensitivierten Latex wird zu allen Proben zugegeben und anschliessend einer mässigen Oszillation unterworfen. Durch Auswerten des erhaltenen Agglutinationsverhaltens kann die Konzentration des menschlichen β_2 -Mikroglobulins in der Probe qualitativ innerhalb weniger Minuten bestimmt werden. Es kann auch eine halbquantitative Bestimmung durchgeführt werden, wenn die Probe in einem Testrohr verdünnt wird und die Reaktionszeit bei jeder Verdünnung beobachtet wird.

Das erfindungsgemässe Präparat zur Messung des menschlichen β_2 -Mikroglobulins in Form eines Latex oder eines Trockenproduktes ist überlegen gegenüber Präparaten, die erhalten werden durch Aufbringen von menschlichem β_2 -Mikroglobulin auf rote Blutzellen oder einen anderen Träger, insofern als andere nichtspezifische Reaktionen als die gewünschte Antigenantikörperreaktion nicht stattfindet, da der Träger selbst keine Antigenizität aufweist. Ferner weil ein menschlicher β_2 -Mikroglobulinantikörper direkt auf einen Latex in einfacher Weise durch einfaches Eintauchen einer

Antikörperlösung in den Latex ohne Verwendung eines Bindemittels aufgebracht werden kann und da eine gute Lagerbeständigkeit gegeben ist.

- Das erfindungsgemässe neue Präparat zur Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin reagiert überhaupt nicht mit anderen Proteinen als menschlichem β_2 -Mikroglobulin und der Träger reagiert nicht mit β_2 -Mikroglobulin. Daher kann gesagt werden, dass der menschliche β_2 -Mikroglobulinantikörper an die Partikel des Latexträgers gebunden ist.
- Die Erfindung gehört im folgenden durch die Beispiele näher beschrieben.

Beispiel A

- Herstellung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin
- 1 kg Ammoniumsulfat wird zugeführt zu ungefähr 2 Liter Urin eines Patienten, der von Nephritis befallen ist und die Lösung wird bei 4°C über Nacht stehengelassen. Die gebildete Ausfällung wird abgetrennt und in Wasser gelöst. Der unlösliche Anteil wird durch Zentrifugieren abgetrennt und die Ausfällung in Salzlösung gelöst und in eine Sephadex G100 (Produkt von Pharmacia Fine Chemicals Co., Ltd., Schweden) Kolonne (5 x 100 cm) gegeben, die gepuffert war mit einem 0,02 M Tris-Puffer (pH 8,0) enthaltend 1 M Natriumchlorid. Zur Durchführung der Gelfiltration wird der Puffer mit einer Durchflussrate von 40 ml pro h zugegeben. Es werden 400 ml eluierter Fraktionen abgetrennt, entsalzt und auf ein Volumen von 10 ml eingengt. Dann wurde das Produkt in eine DEAE-Cellulosekolonne (Produkt von Brown Company, USA) (2,5 x 40 cm) gegeben, die gepuffert wurde mit einem 0,01M Phosphatpuffer (pH 7,5) und eluiert unter linearem Erhöhen der Konzentration des Natriumchlorids in den Puffer auf 0,2 M. Es wurden an erster Stelle 70 ml einer Proteinfraction eluiert, die abgetrennt, entsalzt und auf 10 ml eingengt wurden. Die Flüssigkeit wurde in eine SP-Sephadex C 50 (Pharmacia Fine Chemicals Co., Ltd., Schweden) Kolonne (2 x 35 cm) gegeben, die gepuffert wurde mit einem 0,04 M Phosphatpuffer (pH 5,9) und die Eluierung wurde durchgeführt mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 25 ml/h unter linearer Erhöhung der Konzentration des Puffers auf 0,2 M. 100 ml der Fraktionen von 75–175 ml der Eluate wurden abgetrennt, entsalzt, eingengt und lyophilisiert, wobei 60 mg eines weissen Pulvers erhalten wurden.
- Das Produkt zeigte auf der Elektrophoresescheibe eine einfache Bande.

Beispiel B

- Herstellung von menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper
- Das gemäss Beispiel A erhaltene menschliche β_2 -Mikroglobulin wurde in physiologischer Kochsalzlösung in einer Konzentration von 4 mg/ml gelöst. Die Lösung wurde gemischt mit einer gleichen Menge von vollständigem «Freund's Adjuvans». Die Mischung wurde injiziert in einer Menge von 0,1 ml in die Fusspfoten von vier gesunden Kaninchen mit einem Gewicht von 2,3–2,5 kg, dreimal pro Woche. Eine Woche später wurde ein ml einer 0,1%igen Salzlösung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin injiziert. 3 Wochen nach der ersten Injektion wurde das gesamte Blut aus der Karotidenarterie des Kaninchens entnommen. Das Blut wurde in üblicher Weise zentrifugiert und das erhaltene Serum 30 min bei 56°C gehalten, wobei sich etwa 200 ml Antiserum bildeten.
- Da das erhaltene Antiserum eine einzige Ausfällungsbande mit einem Antigen bildete nach dem Ouchtalony-Verfahren und dem Immunoelktrophoresis-Verfahren, wurde festgestellt, dass es sich um einen einzelnen Antikörper handelt.

Beispiel C

Herstellung von unlöslichem menschlichem β_2 -Mikroglobulin

5 mg menschliches β_2 -Mikroglobulin wurden gelöst in 5 ml eines 0,2 M Essigsäurepuffers (pH 5,0) und dann wurden etwa 0,5 ml einer Lösung eines 5%igen Ochsen Serumalbumins zugefügt. Dann wurden 5% Glutaraldehyd tropfenweise zugegeben, bis sich eine Ausfällung bildete. Die Ausfällung wurde abgetrennt, homogenisiert und dann gewaschen mit PBS, mit einem Glycinsalzsäurepuffer (pH 2,8) und wieder mit PBS, und sodann unterhalb von -20°C aufbewahrt.

Beispiel D

Reinigung von menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper

Zu Antiserum wurde eine gleiche Menge einer gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat zugefügt und eine vollständige Mischung hergestellt. Die Mischung wurde 30 min bei Zimmertemperatur stengelassen. Die gebildete Ausfällung wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, gewaschen mit einer 0,5%igen gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat und dann gegenüber PBS dialysiert. Dann wurde zu dem Dialysat die Lösung von unlöslichem menschlichem β_2 -Mikroglobulin, hergestellt gemäss Beispiel C zugefügt und die Mischung bei Zimmertemperatur 30 min stengelassen. Die Mischung wurde zentrifugiert, wobei sie sich auf trennt in eine überstehende Flüssigkeit und ein Sediment. Zu der überstehenden Flüssigkeit wurde wieder unlösliches menschliches β_2 -Mikroglobulin zugefügt und die Mischung in ähnlicher Weise behandelt. Die zwei Ausfällungen wurden kombiniert und gewaschen mit PBS. Dann wurde ein Glycinsalzsäurepuffer (pH 2,8) zugefügt und die Mischung 5 min geschüttelt, anschliessend zentrifugiert. Die Ausfällung wurde in ähnlicher Weise behandelt mit einem Glycinsalzsäurepuffer und kombiniert mit der erhaltenen überstehenden Flüssigkeit. Die Mischung wurde dialysiert gegenüber PBS, wobei sich ein gereinigter menschlicher β_2 -Mikroglobulinantikörper bildete.

Ausführungsbeispiel 1

Latex, sensibilisiert mit menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper

Ein Polystyrol latex (Produkt von Takeda Chemical Industry, Co., Ltd., SDL 59, spezifisches Gewicht 1,14, Partikeldurchmesser 0,9 Mikron) wurde verdünnt mit PBS, so dass

die Konzentration der Partikel 0,25% betrug und dann eine gleiche Menge eines gereinigten Antikörpers, 60fach verdünnt mit PBS zugefügt. Die Mischung wurde 2 h bei 37°C gehalten und dann zentrifugiert. Die Latexpartikel wurden abgetrennt und gewaschen mit PBS und dann mit einem Verdünnungsmittel. Die Latexpartikel wurden dann in einer Konzentration von 0,25% unter Verwendung eines Verdünnungsmittels suspendiert, wobei sich ein Latex, sensibilisiert mit einem menschlichen β_2 -Mikroglobulinantikörper bildet.

Durch Zugabe einer Lösung eines menschlichen β_2 -Mikroglobulins zu dem sensibilisierten Latex erfolgt Agglutination. Keine Agglutination erfolgte, wenn Albumin, IgG-, IgM- oder IgA-Lösungen zugegeben werden.

Das verwendete Verdünnungsmittel enthielt 0,08% BSA und 0,1% Natriumazid.

Ausführungsbeispiel 2

Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin

Ein Verdünnungsmittel in einer Menge von 0,025 ml wurde in die Vertiefungen einer Mikroplatte vom V-Typ gegeben und 0,025 ml Serum oder Urin verdünnt mit einem geeigneten Verdünnungsmittel zu der ersten Probe zugegeben und sodann fortlaufend verdünnt mit einem Verdünnungsmittel nach der zweifachen Verdünnungsmethode. Andererseits wurden 0,025 ml einer Standardlösung, enthaltend $0,01\ \mu\text{g}$ von menschlichem β_2 -Mikroglobulin pro ml, zugefügt zu der ersten Probe einer anderen Reihe und in derselben Weise verdünnt. Dann wurden 0,025 ml des Latex, sensibilisiert mit dem menschlichen β_2 -Mikroglobulinantikörper in jede der Vertiefungen gegeben und nach ausreichendem Mischen mehr als 10 h bei Zimmertemperatur stengelassen, wobei der Endpunkt der Agglutination beobachtet wurde. Wenn eine Antigenantikörperreaktion stattfand, wurden die Latexpartikel auf der gesamten Oberfläche der Probelöcher dispergiert. Wenn keine Antigenantikörperreaktion erfolgte, sammelten sich die Latexpartikel im Mittelpunkt der Probelöcher. Auf diese Weise konnte der Endpunkt der Agglutination bestimmt werden.

Gemäss dem vorstehenden Verfahren wurde die Menge β_2 -Mikroglobulin bestimmt in sieben Beispielen eines Serums, 100fach verdünnt und sieben Beispielen eines Urins, 50fach verdünnt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1
Bestimmung der Latexagglutination

| Probe | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Konzentration in der Probe ($\mu\text{g/ml}$) |
|--|---|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| Konzentration des Standard- β_2 -Mikroglobulins ($\mu\text{g/ml}$) | 5 | 2,5 | 1,25 | 0,625 | 0,312 | 0,156 | 0,078 | 0,039 | |
| Agglutination | + | + | + | + | - | - | - | - | |
| Serum | | | | | | | | | |
| Gesunder Erwachsener 32 Jahre männlich | + | + | + | + | - | - | - | - | 1 |
| Gesunder Erwachsener 43 Jahre männlich | + | + | + | - | - | - | - | - | 0,5 |
| Gesunder Erwachsener 22 Jahre männlich | + | + | + | + | - | - | - | - | 1 |
| Leukämiepatient 9 Jahre männlich | + | + | + | + | + | + | + | - | 8 |
| Patient mit Magenkrebs 53 Jahre männlich | + | + | + | + | + | + | + | - | 8 |
| Patient 62 Jahre männlich, renaler Verfall | + | + | + | + | + | + | + | + | 16 |
| Patient 32 Jahre weiblich, unter SLE leidend | + | + | + | + | + | + | + | - | 8 |
| Urin | | | | | | | | | |
| Gesunder Erwachsener 32 Jahre männlich | + | + | + | - | - | - | - | - | 0,25 |
| Gesunder Erwachsener 43 Jahre männlich | + | + | - | - | - | - | - | - | 0,13 |
| Gesunder Erwachsener 22 Jahre männlich | + | + | + | - | - | - | - | - | 0,25 |
| Patient 57 Jahre männlich mit Myeloma | + | + | + | + | + | + | + | - | 4 |
| Patient 9 Jahre männlich mit Leukämie | + | + | + | + | + | + | + | - | 4 |
| Patient 62 Jahre mit renalem Verfall | + | + | + | + | + | + | + | + | 8 |
| Patient 32 Jahre weiblich mit SLE | + | + | + | + | + | + | + | - | 4 |

+ : positiv; - : negativ

Ausführungsbeispiel 3

Bestimmung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin nach dem «Gleitaggregations»-Verfahren

Polystyrol latex (Produkt von Dow Chemicals, Partikel-durchmesser $0,22 \pm 0,006$ Mikron, spezifisches Gewicht 1,05) wurde verdünnt auf 1% mit einem Glycinnatriumchloridpuffer (pH 8,4) und eine gleiche Menge eines gereinigten Antikörpers zugefügt. Die Mischung wurde bei 4°C über Nacht stehengelassen und dann zur Abtrennung des Latex zentrifugiert. Der Latex wurde einmal mit einem Glycinnatriumchloridpuffer gewaschen und suspendiert in einer Konzentration von 1% in einem Glycinnatriumchloridpuffer, enthaltend 1% BSA, wobei sich der sensibilisierte Latex bildet.

50 μl einer Lösung von menschlichem β_2 -Mikroglobulin in Konzentrationen von 400, 200, 100, 50 oder 25 $\mu\text{g/ml}$ wurden tropfenweise getrennt zugegeben auf ein Gleitglas. Dann wurden 50 μl des erhaltenen sensibilisierten Latex tropfenweise oben zugegeben und die Reaktion unter mässigem Rühren während weniger Minuten beobachtet. Eine Agglutination trat ein bei den Konzentrationen von 400, 200 und 100 $\mu\text{g/ml}$, jedoch erfolgte keine Agglutination bei einer Konzentration von 50 und 25 $\mu\text{g/ml}$.

Nach dem vorstehenden Verfahren wurde aufgrund von sechs Proben des Serums und 6 Proben des Urins der Gehalt von menschlichem β_2 -Mikroglobulin ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2
Latexagglutination

| Probe | Agglutination | Konzentration in der Probe |
|---|---------------|----------------------------|
| Serum (verdünnt 50fach) | | |
| Gesunder Erwachsener 32 Jahre männlich | - | weniger als 2,5 g/ml |
| Gesunder Erwachsener 42 Jahre männlich | - | dito |
| Gesunder Erwachsener 22 Jahre männlich | - | dito |
| Leukämiepatient 9 Jahre männlich | + | mindestens 5 g/ml |
| Patient 62 Jahre männlich, renaler Verfall | + | dito |
| Patient 32 Jahre weiblich unter SLE leidend | + | dito |
| Urin (verdünnt 10fach) | | |
| Gesunder Erwachsener 32 Jahre männlich | - | weniger als 0,5 g/ml |
| Gesunder Erwachsener 43 Jahre männlich | - | dito |
| Gesunder Erwachsener 22 Jahre männlich | - | dito |
| Leukämiepatient 9 Jahre männlich | + | mindestens 1 g/ml |

Tabelle 2
Latexagglutination

| Probe | Agglutination | Konzentration in der Probe | | | | |
|--|---------------|----------------------------|-----|-----|----|----|
| 5 Patient 62 Jahre männlich, renaler Verfall | + | dito | | | | |
| 10 Patient 32 Jahre weiblich unter SLE leidend | + | dito | | | | |
| 15 Kontrolle | | | | | | |
| Konzentration des Standard- β_2 -Mikroglobulins ($\mu\text{g/ml}$) | | 400 | 200 | 100 | 50 | 25 |
| Agglutination | | ++ | + | + | ± | - |

Ausführungsbeispiel 4

Durch Behandlung wie in Beispiel 1 beschrieben wird ein Latex sensibilisiert, gewaschen und in einem Verdünnungsmittel enthaltend 0,5% Glycin und 0,7% Dextran T-10 (Produkt von Pharmacia Fine Chemicals Co., Ltd., Schweden) suspendiert, so dass die Konzentration der Latexpartikel 1,25% beträgt. Die Suspension wurde dann in üblicher Weise lyophilisiert, wobei ein Präparat von Latexpartikeln, sensibilisiert mit menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper erhalten wird.

Ausführungsbeispiel 5

Zu den Latexpartikeln erhalten gemäss dem vorstehenden Beispiel 4 wird ein Verdünnungsmittel zugefügt, dann in derselben Weise, wie in Beispiel 2 beschrieben, die Menge des β_2 -Mikroglobulins im Serum und Urin bestimmt. Es wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

Wie aus den vorstehenden Ergebnissen hervorgeht, ist die Menge von β_2 -Mikroglobulin im Serum und Urin von Patienten, die von verschiedenen Erkrankungen befallen sind, höher als diejenige bei gesunden Erwachsenen. Daher stellt die Bestimmung der Menge des β_2 -Mikroglobulins im Blut oder Urin eine sehr wertvolle Diagnose dieser Erkrankungen dar.

In derselben Weise, wie im vorstehenden Beispiel D beschrieben, wurde die Menge von β_2 -Mikroglobulin im Serum und Urin von Patienten gemessen unter Verwendung eines Latex, sensibilisiert mit menschlichem β_2 -Mikroglobulinantikörper und zwar aus dem Antiserum der Ziege. Die Ergebnisse waren im wesentlichen dieselben, wie in den vorstehenden Tabellen angegeben.

Mit dem sensibilisierten Latexgemisch der Erfindung kann die Menge von β_2 -Mikroglobulin in kürzerer Zeit gemessen werden, wenn eine Probe verwendet wird (menschliches Serum oder Urin), die nur in einer sehr kleinen Menge von weniger als 0,03 ml vorliegt. Die Empfindlichkeit ist sehr hoch und 1 ng β_2 -Mikroglobulin pro ml der Probe kann bestimmt werden. Daher ergibt das erfindungsgemässe Präparat genaue und wertvolle Informationen für Diagnose von Leukämie, renalen Erkrankungen, Entzündungen usw. und sein Anwendungsbereich ist sehr breit. Da die Probemenge sehr klein ist, ist das Präparat geeignet für Kinder, Neugeborene und Kleinkindern, denen nur eine kleine Menge Blut entnommen werden kann.