

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 158246 B

(21) Patentansøgning nr.: 3731/82

(22) Indleveringsdag: 19 aug 1982

(41) Alm. tilgængelig: 22 feb 1983

(44) Fremlagt: 17 apr 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 aug 1981 CH 5403/81 11 nov 1981 CH 7258/81

(71) Ansøger: *F. Hoffmann-La Roche AG; Postfach; 4002 Basel, CH

(72) Opfinder: Hans *Brodbeck; CH, Harald *Gallati; CH

(51) Int.Cl.⁵

G 01 N 33/543

G 01 N 33/574

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Sandwichfremgangsmåde til bestemmelse af carcinoembryonalt antigen og opløsning til brug ved denne fremgangsmåde

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3731-82

En fastfase-sandwichfremgangsmåde til hurtig bestemmelse af carcinoembryonalt antigen (CEA) udføres ved, at en prøve, der skal undersøges, inkuberes med et første CEA-antistof, der er eller bliver bundet til en vandoploselig bærer, og et andet CEA-antistof, til hvilket der direkte eller via en biotin/avidinbro er bundet peroxidase. Den immunologiske reaktion kan udføres i ét eller to trin. Ved nærværelsen af 0,4-1,0 mol/liter phosphationer, 0,2-0,4 mol/liter sulfationer og 0,2-0,4 mol/liter tartrationer ved den immunologiske reaktion eller ved det andet trin (såfremt der arbejdes i to trin) forkortes inkubationstiden væsentligt. Efter den immunologiske reaktion adskilles faserne, hvorefter peroxidaseaktiviteten måles i den faste eller i den flydende fase som mål for det forhåndenværende CEA i prøven.

DK 158246 B

Opfindelsen angår en fastfasesandwichfremgangsmåde til bestemmelse af carcinoembryonalt antigen (CEA) og en opløsning til brug ved denne fremgangsmåde.

Fra Clin. Chem. 26/12, 1718-1722 (1980) kendes en enzymimmunfremgangsmåde til bestemmelse af carcinoembryonalt antigen (CEA). Ved denne fremgangsmåde inkuberes forudbehandlede serum- eller plasma-prøver i et første trin i 2 timer ved 45°C med kugler, der er sensibiliseret med marsvin-anti-CEA. Efter ét vasketrin inkuberes kuglerne i 2 timer ved 45°C med et konjugat af gede-anti-CEA og peberrodsperoxidase. Efter fjernelse af overskydende konjugat ved vask bestemmes enzymaktiviteten i den faste fase ved kendte metoder. Ved sammenligning af denne værdi med en på analog måde fremstillet standardkurve fastsættes indholdet af CEA i prøven.

Inden for rammerne af den foreliggende opfindelse har det nu overraskende vist sig, at det er muligt at udføre denne fremgangsmåde uden tab af sensitivitet på den samme tid også uden det tids- og arbejdskrævende vasketrin mellem den første og den anden immunologiske reaktion. Denne forenkling bliver mulig, når man udfører inkubationen af den prøve, der skal undersøges, med et første CEA-antistof, der er bundet til den vanduopløselige bærer, og det andet antistof, til hvilket der er bundet peroxidase, i nærværelse af 0,4-1,0 mol/liter phosphationer eller 0,2-0,4 mol/liter sulfationer.

Det har endvidere vist sig, at totrinsmetoden ifølge Clin. Chem. (loc. cit.) kan forkortes tidsmæssigt ved anvendelse af de ovennævnte ioner, idet den anden inkubation kan udføres på den halve tid uden sensitivitetstab, dvs. også på 1 time.

Den ovennævnte enzymimmunfremgangsmåde til bestemmelse af antigener, i det foreliggende tilfælde af CEA, er almindelig kendt som den såkaldte fastfase-sandwichfremgangsmåde. Ved denne fremgangsmåde kan enzymet, især peroxidasen, bindes direkte eller via en biotin/avidinbro til antistoffet.

Den foreliggende opfindelse angår således en fastfase-sandwichfremgangsmåde til hurtig bestemmelse af carcinoembryonalt antigen (CEA)

ved inkubation af den prøve, som skal undersøges, med et første CEA-antistof, der er bundet eller bliver bundet til en vandopløselig bærer, og et andet CEA-antistof, til hvilket peroxidase er bundet enten direkte eller via en biotin/avidinbro, adskillelse af den faste og flydende fase, måling af peroxidaseaktiviteten enten i den faste eller den flydende fase som mål for det forhåndenværende CEA, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at inkubationen udføres i nærværelse af 0,4-1,0 mol/liter phosphationer eller 0,2-0,4 mol/liter sulfationer.

- 10 Som ovenfor anført kan den prøve, som skal undersøges, ved fastfase-sandwichfremgangsmåden ifølge opfindelsen først inkuberes med det ene CEA-antistof, der er bundet til en vandopløselig bærer, og derefter efter et vasketrin inkuberes med det andet CEA-antistof, der er mærket med peroxidase. Da den aktiverende virkning af 0,4-1,0 mol/liter phosphationer eller 0,2-0,4 mol/liter sulfationer påvirker den anden inkubation, udføres denne anden inkubation derfor i nærværelse af disse ioner.

- 20 Som ovenfor anført kan der som første CEA-antistof, der er bundet til en vandopløselig bærer, anvendes et marsvin-CEA-antistof. Som det andet CEA-antistof, til hvilket der er bundet peroxidase, kan der anvendes gede-anti-CEA.

Som første og andet CEA-antistof kan der dog også anvendes to forskellige monoklonale muse-CEA-antistoffer, der begge er rettet mod CEA, men mod forskellige epitoper af CEA.

- 25 Det er endvidere også muligt som første antistof at anvende et monoklonalt muse-CEA-antistof og som andet antistof at anvende et polyclonalt antistof fra et antiserum fra et dyr, fx geden.

- 30 Peroxidasen kan bindes til antistoffet på i og for sig kendt måde, fx den af Wilson og Nakane i "Immunfluorescence and Related Staining Techniques", 1978, side 215 beskrevne metode. Hvad angår de monoklonale muse-CEA-antistoffer, har det vist sig, at deres immunologiske egenskaber i visse tilfælde forringes ved disse kendte metoder. I sådanne tilfælde er det en fordel at biotinyler de monoklonale

5 muse-CEA-antistoffer og derefter omsatte dem med et avidin-peroxidasecomplex. Fremstillingen af avidin-peroxidasecomplexet udføres analogt med den ovennævnte af Wilson og Nakane beskrevne metode. Hvad angår polyklonale antistoffer, dvs. antistoffer fra dyresera, foretrækkes den direkte binding af peroxidasen til antistoffet.

10 Som vanduopløselig bærer til det første antistof kommer følgende i betragtning: organiske og uorganiske polymerer (amylase, dextran, naturlig eller modificeret cellulose, polyacrylamid, agarose, magnetit, porøst glaspulver, polyvinylidenfluorid (Kynar) og latex), indersiden af testbeholdere (testrør, titrerplader eller kuvetter af glas eller kunststof) samt overfladen af faste legemer (stave, kugler eller andre legemer af glas eller kunststof). Særlig egnede bærere til fremgangsmåden ifølge opfindelsen er glas- og kunststofkugler.

15 Antistoffet kan være bundet fysisk (adsorptivt) eller kemisk til den vanduopløselige bærer eller kan bindes under eller efter reaktionen ved hjælp af en yderligere reaktionsdeltager, der på sin side er bundet til en bærer.

20 De immunologiske reaktioner udføres fortrinsvis ved en temperatur på mellem 0 og 55°C. Sædvanligvis forøges den immunologiske reaktionshastighed ved højere temperaturer, hvorved der under i øvrigt ens testbetingelser hurtigere opnås ligevægt.

Den hidtil ukendte fremgangsmåde ifølge opfindelsen er overordentlig følsom og udmærker sig især ved sin korte reaktionstid.

25 Opfindelsen angår også en vandig opløsning til brug ved fremgangsmåden med en pH-værdi på 4-9 indeholdende CEA-antistof, hvortil der er bundet peroxidase, som indeholder 0,4-1,0 mol/liter phosphationer eller 0,2-0,4 mol/liter sulfationer.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler.

EKSEMPEL 1

Kvantitativ bestemmelse af CEA i patientplasma med et monoklonalt CEA-antistof og et sædvanligt CEA-antistof (fra geder)

I hvert af det nødvendige antal testrør (10 x 75 mm) pipetteres 0,2
5 ml testopløsning (0,8 mol/liter $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH-værdi 6,5, med 2 g/liter bovint serumalbumin, 20% normalt gedeserum, 0,2 g/liter 4-amino-antipyrin og 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gede-anti-CEA-peroxidasekonjugat), 0,050 ml af det patientplasma, der skal analyseres, henholdsvis CEA-standard (0 ng/ml CEA, 2,5 ng/ml CEA, 10 ng/ml CEA og 20 ng/ml CEA) og
10 CEA-kontrolserummet (10,2 ng/ml CEA $\pm$ 1,0 ng/ml) blandes i, i hvert rør tilsættes en med monoklonalt muse-anti-CEA-sensibiliseret polystyrenkugle* (diameter = 6,5 mm), og der inkuberes ved 45°C i 4 timer. Derefter vaskes polystyrenkuglerne tre gange med hver gang 2-5 ml destilleret vand, overføres hver især til 0,5 ml substratpuffer
15 til aktivitetsbestemmelse af peroxidase (0,1 mol/liter kaliumcitratpuffer med en pH-værdi på 5,0 med 6 millimol/liter hydrogenperoxid og 40 millimol/liter o-phenylendiamin) og inkuberes i 30 minutter ved stuetemperatur (22°C). For at standse peroxidaseaktiviteten og for at forhøje farveintensiteten iblandes 2,0 ml 1 mol/liter HCl, og absorptionen måles fotometrisk ved bølgelængden 492 nm i løbet af 30 minutter. Tabel 1 viser værdierne for en CEA-bestemmelse sammenlignet med
20 på den ene side de værdier, der fås med Roche-radioimmunoassay (sammenligningsværdi) og på den anden side med de værdier, der fås ved en modificeret (anvendelse af gede-anti-CEA-peroxidasekonjugat i 0,2M phosphatpuffer i stedet for tris-puffer) metode ifølge Clin. Chem. 26/12, 1718-1722 (1980).

* Fremstillingen af monoklonalt muse-anti-CEA sker analogt med den i Journal of Immunological Methods, 32 (1980, side 297-304, beskrevne metode, idet der som udgangscellelinje til fusionen anvendes myelomlinjen Sp 2/01-AG, som den 25. maj 1979 er deponeret hos ATCC under deponeringsnr. CRL 8006, og som blev gjort almindelig tilgængelig den 24. november 1981. Fusionen udføres med miltceller fra mus, der er immuniseret med CEA. Immuniseringen af musene er udført analogt med
30 tabel 1 i den ovennævnte publikation, idet de første to immuniseringer hver især udførtes med 50 μg CEA, immunisering nr. 3 og 4 blev

udeladt, og immunisering nr. 5 blev udført med 50 µg CEA og immuniseringerne nr. 6-8 med hver 200 µg CEA.

Tabel 1

Prøvemateriale		$\Delta A_{492 \text{ nm/RT/30 minutter}}$		
5				
	CEA-standard			
	0 ng/ml CEA	0,105		
	2,5 ng/ml CEA	0,330		
	5,0 ng/ml CEA	0,490		
10	10,0 ng/ml CEA	0,755		
	20,0 ng/ml CEA	1,220		
	CEA-kontrolserum			
	10,2 ng/ml CEA	0,770		
15				
	Patientplasma	ROCHE-RIA test (CEA-indhold)	Modificeret metode ifølge Clin.Chem. (loc.cit.) (CEA-indhold)	Fremgangsmåde ifølge opfindel- sen (CEA-ind- hold)
20		ng/ml	ng/ml	ng/ml
	nr. Pool 1	0,8	0,7	0,7
	nr. Pool 2	1,4	1,0	1,0
25	nr. Pool 3	2,3	2,5	2,4
	nr. 3155	25,0	20,0	22,0
	nr. 3157	3,3	4,1	3,7
	nr. 3368	7,1	6,7	6,9
	nr. 3395	14,8	15,0	14,7
30	nr. 3401	9,0	8,8	9,2
	nr. 3410	23,0	21,0	24,0
	nr. 3419	4,2	4,5	4,4
	nr. 3416	4,1	5,3	5,2
	nr. 3646	5,5	5,2	5,3
35	nr. 3657	5,2	5,5	5,5
	nr. 3679	5,7	5,9	6,0

Værdier på under 2,5 ng/ml CEA ligger i normalområdet, hvorimod værdier over 2,5 ng/ml ligger i det patologiske område. Af tabel 1 fremgår det, at de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen vundne værdier korrelerer godt med de værdier, der fås ved den modificerede metode ifølge Clin. Chem. (loc. cit.) eller ved ROCHE-RIA-testen.

EKSEMPEL 2

Sensitivitetsforøgelse af den enzymimmunologiske CEA-bestemmelse med et monoklonalt muse-anti-CEA og et gede-anti-CEA-peroxidasekonjugat ved tilsætning af 0,8 mol/liter phosphationer

- 10 I hvert af det nødvendige antal testrør (10 x 75 mm) pipetteres 0,5 ml testopløsning (2 g/liter bovint serumalbumin, 20% gedeserum, 0,2 g/liter 4-amino-antipyrin og 0,2 µg/ml gede-anti-CEA-peroxidasekonjugat én gang i 0,2 mol/liter natriumphosphatpuffer og én gang i 0,8 mol/liter natriumphosphatpuffer med en pH-værdi på 6,5), 0,050 ml
- 15 CEA-standard (0 ng/ml CEA, 2,5 ng/ml CEA, 5,0 ng/ml CEA, 10,0 ng/ml CEA og 20,0 ng/ml CEA) og CEA-kontrolserum (10,2 ng/ml CEA ± 1,0 ng/ml) blandes i, til hvert rør sættes en med monoklonalt muse-CEA-antistof sensibiliseret polystyrenkugle (diameter = 6,5 mm), og der inkuberes ved 45°C i 4 timer. Derefter vaskes polystyrenkuglerne tre
- 20 gange med hver gang 2-5 ml destilleret vand, overføres hver især til 0,5 ml substratpuffer til aktivitetsbestemmelse af peroxidase (0,1 mol/liter kaliumcitrat med en pH-værdi på 5,0 med 6 millimol/liter hydrogenperoxid og 40 millimol/liter o-phenylendiamin) og inkuberes i
- 25 viteten samt for at forøge farveintensiteten tilsættes 2,0 ml 1 mol/liter HCl, og absorptionen måles fotometrisk ved bølgelængden 492 nm i løbet af 30 minutter. I tabel 2 er der anført de værdier, der fås med 0,2 mol/liter og 0,8 mol/liter natriumphosphatpuffer.

Tabel 2

		$\Delta A_{492 \text{ nm/RT/30 minutter}}$	
CEA-standard		med 0,2 mol/liter	med 0,8 mol/liter
ng/ml CEA		phosphationer	phosphationer
5	0	0,050	0,130
	2,5	0,125	0,290
	5,0	0,230	0,450
	10,0	0,400	0,770
10	20,0	0,780	1,400
<i>CEA-kontrolserum</i>			
	10,2	0,430	0,800

- 15 Af tabel 2 fremgår det tydeligt, at følsomheden forøges betydeligt under anvendelse af 0,8 mol/liter phosphationer i forhold til 0,2 mol/liter phosphationer.

EKSEMPEL 3

- 20 Sensitivitetsforøgelse af den enzymimmunologiske CEA-bestemmelse med et monoklonalt muse-anti-CEA og et gede-anti-CEA-peroxidasekonjugat ved tilsætning af 0,4 mol/liter sulfationer

- 25 I hvert af det nødvendige antal testrør (10 x 75 mm) pipetteres 0,5 ml testopløsning (2 g/liter bovint serumalbumin, 20% gedeserum, 0,2 g/liter 4-amino-antipyrin og 0,2 µg/ml gede-anti-CEA-peroxidasekonjugat i 0,2 mol/liter natriumphosphatpuffer én gang uden sulfationer og én gang med 0,4 mol/liter sulfationer (natriumsulfat) med en pH-værdi på 6,5), 0,050 ml CEA-standard (0 ng/ml CEA, 2,5 ng/ml CEA, 5,0 ng/ml CEA, 10,0 ng/ml CEA og 20,0 ng/ml CEA) og CEA-kontrolserum (10,2 ng/ml CEA ± 1,0 ng/ml) blandes i, til hvert testrør sættes en
- 30 med monoklonalt muse-CEA-antistof sensibiliseret polystyrenkugle (diameter = 6,5 mm), og der inkuberes ved 45°C i 4 timer. Derefter

vaskes polystyrenkuglerne tre gange med hver gang 2-5 ml destilleret vand, overføres hver især til 0,5 ml substratpuffer til aktivitetsbestemmelse af peroxidase (0,1 mol/liter kaliumcitrat med en pH-værdi på 5,0 med 6 millimol/liter hydrogenperoxid og 40 millimol/liter o-phenylendiamin) og inkuberes i 30 minutter ved stuetemperatur (22°C). For at standse peroxidaseaktiviteten og for at forøge farveintensiteten tilsættes 2,0 ml 1 mol/liter HCl, og absorptionen måles fotometrisk ved bølgelængden 492 nm i løbet af 30 minutter. I tabel 3 er der anført de værdier, der fås med 0,2 mol/liter natriumphosphatpuffer én gang uden sulfationer og én gang med 0,4 mol/liter sulfationer.

Tabel 3

		$\Delta A_{492 \text{ nm/RT/30 minutter}}$	
CEA-standard		uden	med 0,4 mol/liter
15	ng/ml CEA	sulfationer	sulfationer
	0	0,050	0,135
	2,5	0,125	0,350
	5,0	0,230	0,520
20	10,0	0,400	0,890
	20,0	0,780	1,620
<i>CEA-kontrolserum</i>			
	10,2	0,430	0,930
25			

Af tabel 3 fremgår det tydeligt, at sensitiviteten forøges betydeligt ved tilstedeværelsen af sulfationer.

EKSEMPEL 4

Forøgelse af testfølsomhed som følge af forhøjet fosfatkoncentration ved brug af monoklonalt, biotinyleret anti-CEA og avidin-peroxidasecomplexet

I hvert af det nødvendige antal testrør (10 x 75 mm) pipetteres 0,2 ml testopløsning (0,2 mol/liter henholdsvis 0,8 mol/liter natriumphosphatpuffer med en pH-værdi på 6,5 med 2 g/liter bovint serumalbumin, 20% gedeserum, 0,1 g/liter 4-amino-antipyrin og 480 ng/ml monoklonalt muse-anti-CEA-(C-3)-biotin/avidinperoxidase). I denne forud givne testopløsning blandes 0,050 ml CEA-standard (0 ng/ml CEA, 2,5 ng/ml CEA, 5,0 ng/ml CEA, 10,0 ng/ml CEA og 20 ng/ml CEA), til hvert testrør sættes en med monoklonalt muse-anti-CEA-(C-19) sensibiliseret polystyrenkugle (diameter = 6,5 mm), og der inkuberes ved 37°C i 16 timer. Derefter vaskes polystyrenkuglerne tre gange med hver gang 2-5 ml destilleret vand, kuglerne overføres hver især til 0,5 ml substratpuffer (0,1 mol/liter kaliumcitrat med en pH-værdi på 5,0 med 6 millimol/liter hydrogenperoxid og 40 millimol/liter o-phenylendiamin) til aktivitetsbestemmelse af den til kuglerne immunologisk bundne peroxidase, og der inkuberes i 30 minutter ved 18-26°C. For at standse peroxidaseaktiviteten og for at forøge farveintensiteten tilsættes 2,0 ml 1M saltsyre, og ekstinktionen måles fotometrisk ved bølgelængden 492 nm i løbet af 30 minutter. I tabel 4 er der anført værdierne for CEA-standarderne.

20

Tabel 4

		$\Delta A_{492 \text{ nm}/20^\circ\text{C}/30 \text{ minutter}}$	
CEA-standard		0,2 mol/liter	0,8 mol/liter
ng/ml CEA		phosphatpuffer	phosphatpuffer
25	0	0,080/0,080	0,090/0,095
	2,5	0,160/0,170	0,310/0,315
	5,0	0,230/0,235	0,450/0,460
	10	0,425/0,435	0,830/0,850
	20	0,810/0,825	1,700/1,650

30

Det fremgår tydeligt af tabel 4, at sensitiviteten forøges væsentligt ved en forhøjet phosphatkonzentration.

De i dette eksempel anvendte monoklonale muse-anti-CEA-antistoffer fås analogt med den i Journal of Immunological Methods, 32 (1980),

side 297-304, beskrevne metode, idet der dog som udgangscellelinje til fusionen anvendes det omtalte myelomlinje Sp 2/01-AG.

Fusionen udføres med miltceller fra mus, der er immuniseret med CEA. Immunisering af musene udførtes analogt med tabel 1 i den ovennævnte publikation, idet de to første immuniseringer hver især udførtes med 50 µg CEA, immunisering nr. 3 og 4 blev udeladt, immunisering nr. 5 udførtes med 50 µg CEA, og immunisering nr. 6-8 hver især udførtes med 200 µg CEA. Der anvendes to forskellige egnede monoklonale antistoffer, der er rettet mod forskellige epitoper af CEA-antigenet, og som betegnes som henholdsvis anti-CEA (C-3) og anti-CEA (C-19).

IgG-Fraktion af anti-CEA (C-3)-antistofferne dialyseres natten over ved 2-8°C mod 0,1 mol/liter natriumhydrogencarbonatopløsning (pH-værdi 8,2-8,5) og indstilles til en proteinkoncentration på 1 mg/ml. Til hver ml proteinopløsning sættes 120 µl af en helt frisk fremstillet biotin-succinimidesteropløsning (1 mg/ml i dimethylsulfoxid), og der inkuberes i 4 timer ved stuetemperatur. Derefter dialyseres biotin-antistofkonjugatet ved 2-8°C mod fosfatpufret, fysiologisk saltopløsning med 0,66 mg/liter Merfen®. Som proteinstabilisator tilsættes 10 mg/ml bovint serumalbumin.

Til kobling af peroxidase til avidin opløses 5 mg avidin i 2,5 ml af en 0,1 mol/liter natriumhydrogencarbonatopløsning (pH-værdi 9,5) og dialyseres natten over ved 2-8°C mod den samme opløsning. 10 mg peroxidase fra peberrod opløses i 3,0 ml destilleret vand, lades henstå i 1 time ved stuetemperatur, blandes derefter med 0,5 ml af en vandig, frisk fremstillet 0,1 mol/liter natriumperiodatopløsning og inkuberes i nøjagtig 20 minutter ved stuetemperatur. Derefter befries peroxidasen ved ultrafiltrering for overskydende natriumperiodat og koncentrerer til det oprindelige volumen. Efter ultrafiltreringen sættes peroxidaseopløsningen til avidinopløsningen, hvorefter der inkuberes i 2 timer ved stuetemperatur. Til reduktion af de Schiff'-ske baser og dermed til stabilisering af den kovalente binding sættes 0,5 ml af en frisk fremstillet, vandig, 0,1 mol/liter natriumborhydridopløsning til avidin-peroxidaseopløsningen, hvorefter der inkuberes mindst 2 timer ved 2-8°C. Derefter dialyseres avidin-peroxidasekonjugatet mod en fosfatpufret, fysiologisk saltopløsning med

0,66 mg/liter Merfen® og stabiliseres med 10 mg/ml bovint serumalbumin.

Til dannelse af complexet blandes 55 μ l anti-CEA (C-3)-antistof-biotinkonjugat med 48 μ l avidin-peroxidase-konjugat, og der inkuberes i
5 15 minutter ved stuetemperatur.

Til anvendelsen ifølge opfindelsen fortyndes complexet med en opløsning, der indeholder 0,20 mol/liter eller 0,80 mol/liter natriumphosphatpuffer med en pH-værdi på 6,5, 2 g/liter bovint serumalbumin, 20% gedeserum og 0,1 g/liter 4-amino-antipyrin.

10 PATENTKRAV

1. Fastfase-sandwichfremgangsmåde til hurtig bestemmelse af carcinoembryonalt antigen (CEA) ved inkubation af den prøve, der skal undersøges, med et første CEA-antistof, der er eller bliver bundet til en vanduopløselig bærer, og et andet CEA-antistof, hvortil der direkte
15 eller via en biotin/avidinbro er bundet peroxidase, adskillelse af den faste og flydende fase, måling af peroxidaseaktiviteten enten i den faste eller i den flydende fase som mål for det forhåndenværende CEA,

k e n d e t e g n e t ved, at inkubationen udføres i nærværelse af
20 0,4-1,0 mol/liter phosphationer eller 0,2-0,4 mol/liter sulfationer.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at prøven først inkuberes med det første CEA-antistof, der er eller bliver bundet til en vanduopløselig bærer, og derpå efter et vasketrin inkuberes med det andet CEA-antistof, til
25 hvilket der direkte eller via en biotin/avidinbro er bundet peroxidase, idet den anden inkubation udføres i nærværelse af 0,4-1,0 mol/liter phosphationer eller 0,2-0,4 mol/liter sulfationer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at der for ét antistofs vedkommende er
30 bundet peroxidase direkte til antistoffet.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3,
k e n d e t e g n e t ved, at begge CEA-antistofferne fås fra anti-
sera fra forskellige dyrearter, og at der for ét antistofs vedkom-
mende er bundet peroxidase direkte til antistoffet.
- 5 5. Fremgangsmåde ifølge krav 4,
k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes CEA-antistof fra geder og
marsvin, og at der for gede-antistoffets vedkommende er bundet
peroxidase direkte til antistoffet.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2,
10 k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes to forskellige monoklo-
nale muse-CEA-antistoffer, og at der for det ene monoklonale muse-
CEA-antistofs vedkommende er bundet peroxidase til antistoffet via en
biotin/avidinbro.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 3,
15 k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et CEA-antistof, der fås
fra et antiserum fra et dyr, samt et monoklonalt muse-CEA-antistof,
og at der for det fra et antiserum vundne antistofs vedkommende er
bundet peroxidase direkte til antistoffet.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 7,
20 k e n d e t e g n e t ved, at der som CEA-antistof anvendes gede-
CEA-antistof og monoklonalt muse-CEA-antistof, og at der for gede-
CEA-antistoffets vedkommende er bundet peroxidase direkte til anti-
stoffet.
9. Vandig opløsning med en pH-værdi på 4-9 indeholdende CEA-antistof,
25 til hvilket der direkte eller via en biotin/avidinbro er koblet
peroxidase,
k e n d e t e g n e t ved, at opløsningen indeholder 0,4-1,0 mol/li-
ter phosphationer eller 0,2-0,4 mol/liter sulfationer.
10. Vandig opløsning ifølge krav 9,
30 k e n d e t e g n e t ved, at peroxidasen er koblet direkte til
antistoffet.