



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

- 
- (21) Patentansøgning nr.: 2417/87 (51) Int.Cl.5      G 01 N 33/537
  - (22) Indleveringsdag: 12 maj 1987 G 01 N 33/543
  - (41) Alm. tilgængelig: 13 nov 1987
  - (45) Patentets meddelelse bkg. den: 10 okt 1994
  - (86) International ansøgning nr.: -
  - (30) Prioritet: 12 maj 1986 US 862123
  
  - (73) Patenthaver: \*Diagnostic Products Corporation; 5700 West 96th Street; Los Angeles; Californien 90045, US
  - (72) Opfinder: A. Said \*El Shami; US, Olusola O. \*Alaba; US, Charles A. \*Kasal; US

(74) Fuldmægtig: Lehmann & Ree A/S

**(54) Fremgangsmåde til måling af niveauet af antigener, antistoffer eller haptener i en flydende prøve**

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g. skrift. nr. 177191  
GB off.g. skrift. nr. 2084317

2417-87

(57) Sammendrag:

Antigener eller antistoffer i kredsløbet måles ved at anvende et ligandmærket, specifikt antigen eller et ligandmærket, specifikt antistof, som er kemisk bundet til en opløselig matrix eller rygrad, et anderledes mærket anti-antigen eller anti-antistof og en fastfaseanti-ligand rettet mod den ligand, som er bundet til det specifikke antigen eller det specifikke antistof. Dette kan opnås ved to analysemetoder:

a) en patientprøve omsættes med et ligandmærket, specifikt antigen eller et ligandmærket, specifikt antistof i væskefasen i nærværelse af et anderledes mærket specifikt anti-antigen eller et anderledes mærket, specifikt anti-antistof. Dette immunologiske kompleks omsættes med én på en fast bærer immobiliseret anti-ligand, som er rettet mod den ligand, der er bundet til det specifikke antigen eller antistof gennem den flydende matrix. Den faste fase vaskes derefter og undersøges for mærkning på anti-antigenet eller på anti-antistoffet, hvilken mærkning er direkte proportional med koncentrationen af specifik antigen eller antistof.

LN 107004 B I

2417-87

b) En patientprøve omsættes med et ligandmærket, specifikt antigen eller et ligandmærket, specifikt antistof i væskefasen, hvorefter væskefasen kontaktes med en på en fast bærer immobiliseret anti-ligand, den faste bærer vaskes og omsættes med et anderledes mærket antigen eller antistof. Dette efterfølges af genvaskning af den faste bærer og undersøgelse for tilstedeværelse af mærkning knyttet til anti-antigenet eller anti-antistoffet, hvilken mærkning er direkte proportional med koncentrationen af det specifikke antigen eller antistof. Liganden bindes covalent til det specifikke antigen eller antistof gennem en opløselig, flydende matrix eller rygrad, hvortil det specifikke antigen eller antistof er blevet kemisk bundet. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan anvendes til påvisning af en lang række antigener eller antistoffer.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til måling af niveauet af et antigen, antistof eller haptent i en flydende prøve.

Væskefase- og fastfaseimmunoanalyser og talrige modifikationer og variationer heraf er blevet beskrevet i litteraturen til måling af en mængde antigener og antistoffer i kredsløbet. Der er blevet udstedt talrige US-patenter og patenter fra andre lande vedrørende et eller flere aspekter ved immunoanalysemetoder.

Kompetitive dobbeltantistofimmunoanalysemetoder med isotopmærkning og separation har spillet en væsentlig rolle ved målingen af antigener og haptener. Sådanne metoder er følsomme og reproducerbare, men kræver centrifugering for at separere det frie, mærkede antigen eller haptent fra den antistofbundne mærkning. Skønt sådanne metoder udnytter førsteordenvæskefasekinetik, bygger de på en polyethylenglycolkatalyseret anden antistofseparation. Der er adskillige iboende ulemper ved sådanne systemer; nemlig (a) det strenge krav vedrørende et meget oprenset antigen eller haptent til isotopmærkning og (b) høj uspecifik binding, hvilket tildels skyldes sporingsisotopurehed og -ustabilitet og/eller den anden antistofseparation udført med polyethylenglycol.

Kompetitive dobbeltantistofimmunoanalysemetoder med enzymmærkning og separation er blevet anvendt i meget mindre skala. Antigen- eller haptenzymmærkninger har, skønt de er mere stabile end de modsvarende isotopmærkninger, ulemper ved sådanne analyser på grund af ekstrem høje uspecifikke bindinger og kræver multiple vask, hvilket således nedsætter følsomheden og reproducerbarheden.

Anvendelse af fluorescerende eller kemiluminicerende mærkninger i stedet for i dobbeltantistofanalyserne af den kompetitive type har ikke helt løst det iboende problem med uspecifik binding og begrænset følsomhed og reproducerbarhed af sådanne metoder. Homogene enzymimmunoanalyser som beskrevet i US patent nr. 3.817.837 har tildels været rettet mod problemet med uspecifik binding beskrevet ovenfor for kompetitive dobbeltantistofmetoder med ikke-isotopisk mærkning og separation. Den lære, man kan drage af US patent nr. 3.817.837, er imidlertid begrænset til lavmolekylære haptener, som er tilstede i temmelig høje koncentrationer i legemsvæsker.

Ved den kompetitive immunoanalyse med fluorescenspolarisation, som er beskrevet i US patent nr. 4.420.568, har man med held elimineret de fleste af de følsomhedsproblemer, som er beskrevet i US patent nr. 3.817.837, men indtil nu har anvendelsen heraf været

begrænset til små molekyler. Der er siden blevet omtalt andre kompetitive fluorescensimmunoanalyser for højmolekylære antigener, men ligesom med fluorescenspolarisation kræver de til deres udøvelse et instrument, som er specielt beregnet hertil.

5 Kompetitive fastfaseimmunoanalyser har været i brug i det sidste tiår og har gradvis erstattet kompetitive dobbeltantistofmetoder med separation for lavmolekylære haptener og adskillige større antigener med en molekylvægt på mindre end 30.000 dalton. Sådanne kompetitive fastfaseimmunoanalyser med isotopmærkning er  
10 praktisk talt fri for de problemer med uspecifik binding, som er forbundet med kompetitiv væskefaseimmunoanalyser, men kan ikke anvendes med højmolekylære antigener, hvilket tildels hovedsagelig skyldes sterisk hindring på det faste bæremateriale.

Kompetitive fastfaseimmunoanalyser med ikke-isotopmærkning er  
15 forbundne med lignende problemer med hensyn til sterisk hindring på det faste bæremateriale og i tilfælde med enzymmærkninger adderer størrelsen af selve mærkningen også til det steriske problem. Den foreliggende opfindelse retter sig mod nogle af de i kompetitiv fastfaseanalyse iboende steriske hindringsproblemer vedrørende  
20 fastfasebærematerialer. Immunometriske fastfaseanalyser med eller uden isotopmærkning er blevet veludviklet til målingen af højmolekylære, polyvalente antigener og antistoffer. Der er blevet publiceret adskillige metoder, og i den senere tid er der blevet udstedt adskillige US-patenter og patenter i andre lande, som beskriver  
25 adskillige aspekter ved denne analytiske metode.

US patent nr. 3.654.090 var en af de tidligste belæringer vedrørende en sekventiel, totrinsimmunoenzymometrisk analyse til påvisningen af polyvalente antigener. Der har siden været anvendt adskillige modifikationer af dette patents oprindelige belæring til  
30 målingen af højmolekylære antigener under anvendelse af signalfrembringende prober med eller uden isotopmærkning.

Af indlysende analytiske grunde er det vel godtgjort, at anvendelsen af to forskellige polyklonale antistoffer rejst i forskellige arter rettet mod det samme antigen (ét immobiliseret på et fast  
35 bæremateriale og det andet mærket med en signalfrembringende probe) forøger analysens følsomhed og nedsætter i en vis udstrækning baggrundssignaler i immunometriske analyser. US patent nr. 4.376.110 angår anvendelsen af to monoklonale antistoffer rettet mod to forskellige epitoper på polyvalente antigener i immunometrisk

analyser. I modsætning til US patent nr. 3.654.090 udnyttes i US patent nr. 4.376.110 et ikke-sekventielt analysesystem med coinkubering. I US patent nr. 4.474.892 beskrives også på lignende måde et dobbeltsidet (to epitoper) immunometrisk analysesystem, hvortil  
5 anvendes monoklonale antistoffer af forskellige klasser eller subklasser rettet mod det samme antigen. Skønt man med de ovenfor beskrevne metoder opnår acceptabel følsomhed, specificitet og i en vis udstrækning reducerede baggrundssignaler, har de alle den ulempe, at de er forbundet med lav reaktionskinetik på grund af  
10 immobiliseringen af antistoffet på det faste bæremateriale og en reaktion af fastfasetyper. Det er vel underbygget, at fastfasereaktioner har lavere reaktionskinetik end væskefasereaktioner og også har lavere forhold mellem signal og baggrund, selv om det immobiliserede antistof har en højere affinitetskonstant forud for immobilisering. Dette skyldes i høj grad steriske hindringsproblemer på det  
15 faste bæremateriale. Hvis sådanne metoder ikke optimeres på den rigtige måde hvad angår mængden af immobiliseret antistof og koncentrationen og den specifikke aktivitet af den signalproducerende probe fastgjort til det andet antistof kan den såkaldte "højdosishægteeffekt" (eng: "high-dose hook effect") sætte sådanne metoders  
20 pålidelighed og gyldighed på spil.

En yderligere ulempe ved immunometriske metoder er inkonsistensen ved antistofimmobiliseringsprocessen fra portion til portion. I US patent nr. 4.496.654 diskuteres dette problem med inkonsistent immobilisering af antistoffer, og det anføres, at ved først  
25 at immobilisere avidin på et fast bæremateriale, derefter omsætte dette bæremateriale med biotinyleret antistof til frembringelse af et fastfaseantistofbæremateriale opnås ensartet immobilisering. Ved den diskuterede modifikation er lavere reaktionskinetik imidlertid uundgåelig, og faren for en "højdosishægteeffekt" er stadig sandsynlig. Den foreliggende opfindelse retter sig mod disse mangler og de i disse immunometriske analyser iboende ulemper.

Modifikationer af klassiske immunometriske analyser til påvisning af antigener er også blevet udstrakt til målingen af specifikke antistoffer ved at anvende immobiliserede antigener som immunosorbanset. En særlig applikation af sådanne metoder er blevet meget anvendt til påvisning af allergenspecifikke immunoglobuliner, IgE (reagin-immunoglobuliner). Historisk har test af specifikke allergener fulgt belæringerne i US patent nr. 3.720.760 og de tilsvarende

patenter fra andre lande, hvor specifikke allergener immobiliseres på et fast bæremateriale (hovedsagelig filterpapirskiver) og omsættes med en patientprøve, som mistænkes for at indeholde det allergenspecifikke immunoglobulin IgE. Efter en initiel inkubering (typisk 24 timer) vaskes det faste bæremateriale for at fjerne enhver uspecifik binding fra serumkomponenterne, derefter får det faste bæremateriale lov til at reagere med et mærket antistof mod IgE. Efter et andet vasketrin undersøges det faste bæremateriale for tilstedeværelse af mærket materiale. Denne fremgangsmåde har, skønt den er meget anvendt, adskillige ulemper; nemlig langsom reaktionskinetik på grund af fastfasereaktionerne, vanskeligheder ved at frembringe immobiliserede allergener, som har de samme bindingskarakteristika som de naturlige allergener overfor IgE og uoverensstemmelse ved frembringelse af et fastfaseallergen fra en portion til den næste.

For nylig beskrev Aalberse et al., (J.Imm.Methods 87:51-57 (1986)) anvendelsen af haptentmodificerede antigener i stedet for fastfasekoblede antigener i en analyse af radioallergosorbenstest-typen. Ved en sådan analyse omsættes en patientprøve, som mistænkes for at indeholde specifik allergen-IgE, med trinitrobenzensulfonsyre-(TNP)-modificeret specifik allergen i to timer, og omsættes derefter yderligere natten over med et fastfasekoblet anti-TNP til dannelse af IgE-allergen-TNP-anti-TNP-kompleks. Den faste fase vaskes og omsættes igen natten over med <sup>125</sup>I-anti-IgE-antistof, vaskes igen og tælles for tilstedeværelse af <sup>125</sup>I-isotop, som er direkte proportional med koncentrationen af allergenspecifik IgE i patientprøven. Ved denne fremgangsmåde hævder forfatterne at have opnået fordelene med væskefasekinetik i den første reaktion, men de dokumenterer ikke TNP-mærkningsgraden af deres allergener. Direkte mærkning af allergener med haptener, såsom TNP, giver det problem, at man mister visse vitale allergene komponenter, som måske ikke mærkes ved en sådan fremgangsmåde, og de vil således ikke blive kvantificeret ved fremgangsmåden. Det lykkes heller ikke forfatterne at vise en forøget reaktionstid (2 dage) sammenlignet med den metode, der er beskrevet i US patent nr. 3.720.760.

Ved den foreliggende opfindelse undgås de problemer, der er forbundet med den traditionelle allergentestmetode og modifikationer heraf.

Den foreliggende opfindelse angår således en fremgangsmåde til

måling af niveauet af et antigen ( $Ag_1$ ), antistof ( $Ab_1$ ) eller haptent (H) i en flydende prøve, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der i en væskefasereaktion dannes et opløseligt kompleks, hvori antigenet ( $Ag_1$ ), antistoffet ( $Ab_1$ ) eller haptent (H) er bundet gennem henholdsvis et specifikt antistof (Ab), antigen (Ag) eller antihaptent (anti-H) til en matrix, som er opløselig i væskefasen og bærer en ligand (X), og at der derefter dannes et uopløseliggjort kompleks, som omfatter en fast bærer bundet til liganden (X) af det opløselige kompleks gennem en anti-ligand (Y), hvor det uopløseliggjorte kompleks bærer et mærke (Z), som er bundet til antigenet ( $Ag_1$ ) via et anti-antigen (anti- $Ag_1$ ), til antistoffet ( $Ab_1$ ) via et anti-antistof (anti- $Ab_1$ ) eller til haptent (H), at det uopløseliggjorte kompleks vaskes, og at det vaskede uopløseliggjorte kompleks undersøges for tilstedeværelse af mærket (Z) for at tilvejebringe et mål for niveauet af antigen ( $Ag_1$ ), antistof ( $Ab_1$ ), eller haptent (H) i prøven.

Fremgangsmåden med at fæstne antigener eller antistoffer til en flydende, opløselig matrix, som derefter mærkes med en given ligand, tjener mindst to særskilte formål:

(a) det forøger det potentielle antal immunokomplekser, som kan immobiliseres på en fast bærer via en anti-ligand, eftersom det kun er nødvendigt, at nogle få ligander fæstnes til den flydende matrix for at opnå fuldstændig immobilisering af hele immunokomplekset. Direkte mærkning af antigener eller antistoffer med en given ligand uden brug af en flydende matrix som her beskrevet ville begrænse antallet af immunokomplekser, som kan immobiliseres på den faste bærer ved hjælp af en anti-ligand, eftersom der er mulighed for, at kun nogle få antigener eller antistoffer ville blive mærket med en given ligand, og det ville kræve anvendelse af minutiøse affinitets-kromatografimetoder for at separere de ligandmærkede antigener eller antistoffer fra de umærkede antigener eller antistoffer,

(b) fordelene ved at anvende væskefasekinetik i den første reaktion er indlysende, eftersom det letter dannelsen af immunokomplekset mellem antigenerne eller antistofferne fæstnet til den flydende matrix og det signalfremkaldende, mærkede anti-antigen eller anti-antistof.

Hvis væskefasekinetik ikke er eftertragtet kan belæringen ifølge den foreliggende opfindelse anvendes til at fremstille

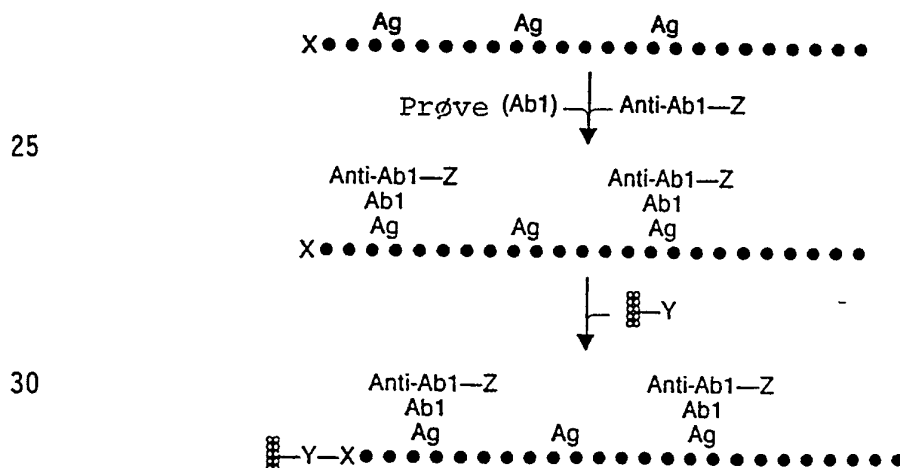
effektive fastfasematrixer ved at fæstne antigener eller antistoffer til en flydende matrix og mærke denne matrix med en given ligand, derefter præomsætte denne matrix med en fastfasebærer indeholdende en anti-ligand.

- 5 Der beskrives adskillige analytiske systemer i forbindelse med opfindelsen.

System I: Ikke-sekventiel analyse:

10 En patientprøve, som mistænkes for at indeholde et givent antigen eller antistof, omsættes i væskefase med den flydende matrix, som indeholder det ligandmærkede antistof eller det ligandmærkede antigen i nærværelse af et anderledes mærket specifikt anti-antistof eller et anderledes mærket, specifikt anti-antigen. Dette immunologiske kompleks omsættes i væskefasen med en anti-ligand immobiliseret på en fast bærer, hvilken anti-ligand er rettet mod den ligand, der er fæstnet til det specifikke antigen eller antistof via den flydende matrix. Den faste fase vaskes derefter og undersøges for den signalfrembringende mærkning, der er signal fastgjort til anti-antigenet eller anti-antistoffet. Dette kan vises grafisk for påvisningen af antigener eller antistoffer på følgende måde:

(a) ikke-sekventiel analyse til påvisning af antistof:



Vask og undersøg for z.

Hvor Ab1 = cirkulerende antistof, som skal måles.

- 35 Ag = specifik antigen rettet mod Ab1 og som er covalent fastgjort til den flydende matrix.

X = ligand covalent fastgjort til den flydende matrix.

Y = anti-ligand covalent eller passivt fastgjort til den faste bærer.

Z = signalfremkaldende mærkning (enzym, radioaktiv mærkning, fluorescerende forbindelse, kemiluminiserende forbindelse, bioluminiserende forbindelse eller et enzymsubstrat).

5    ●●●●● = den flydende matrix.

Koncentrationen af antistoffet Ab1 er direkte proportional med det signal, som frembringes af Z.

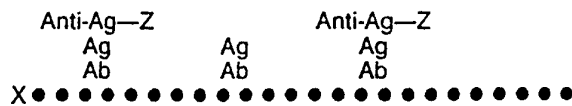
(b) Ikke-sekventiel analyse til påvisning af antigen:

10



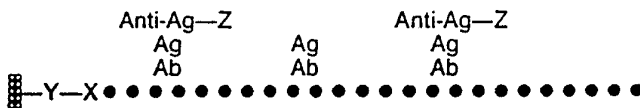
Prøve (Ag) ↓ Anti-Ag-Z

15



Vask, tilføj: ↓ Y

20



25 Genvask den faste fase og undersøg for Z, hvor koncentrationen af cirkulerende Ag er direkte proportional med det signal, som frembringes af Z.

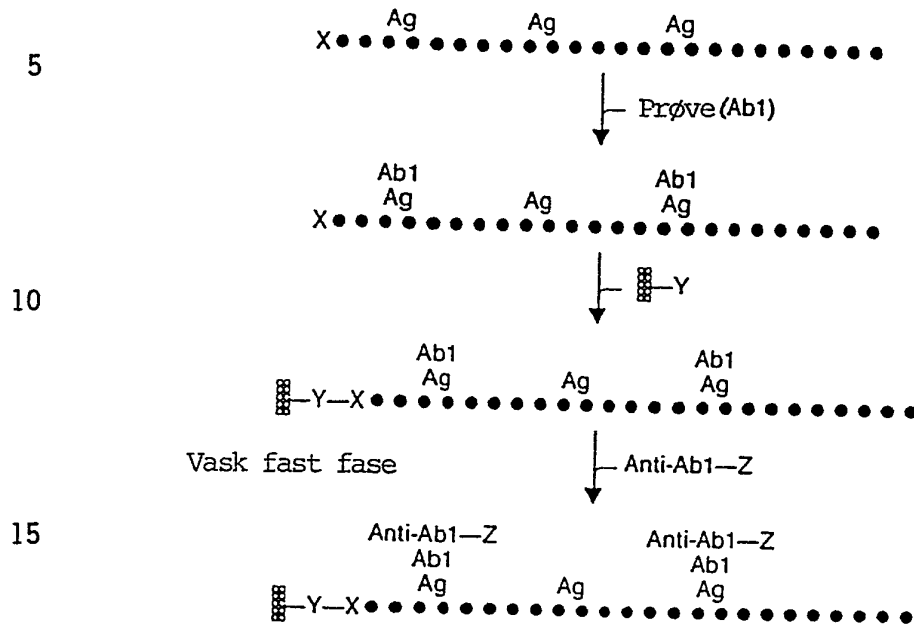
25

System II: Sekventielle analyser:

30 I sekventielle analyser omsættes patientprøven med ligandmærket specifik antigen eller antistof i væskefasen, kontaktes derefter med fastfaseantiliganden og får lov til at reagere i en specifik tidsperiode. Den faste fase vaskes derefter og omsættes igen med et anti-antigen eller anti-antistof mærket med en signalfremkaldende probe. Den faste fase genvaskes og undersøges for den signalfremkaldende probe.

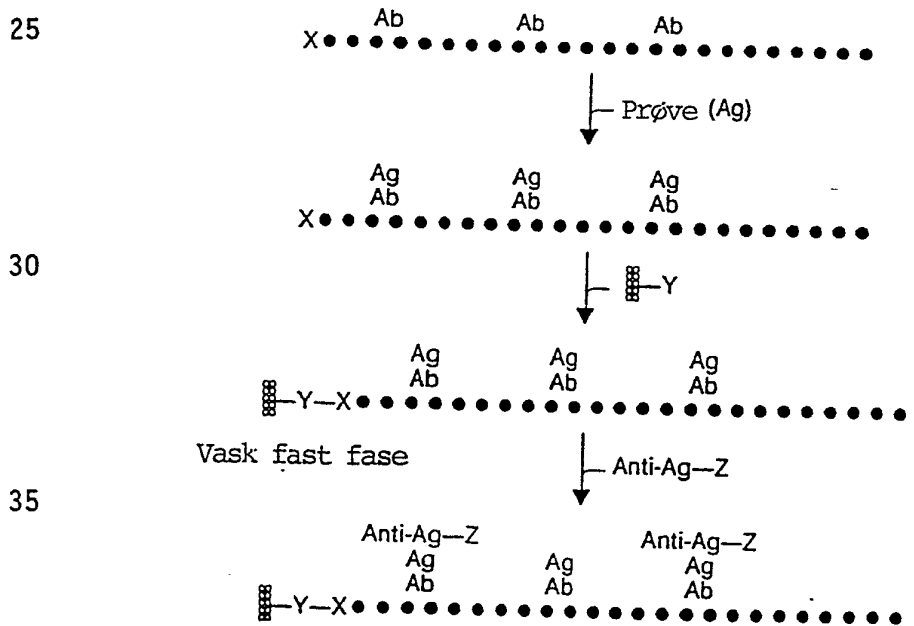
35 Det efterfølgende er den skematiske præsentation af et sådant koncept:

(a) Sekventiel analyse til påvisning af antistof:



20 Vask fast fase og undersøg for Z.

(b) Sekventiel analyse til påvisning af antigen:



Vask fast fase og undersøg for Z.

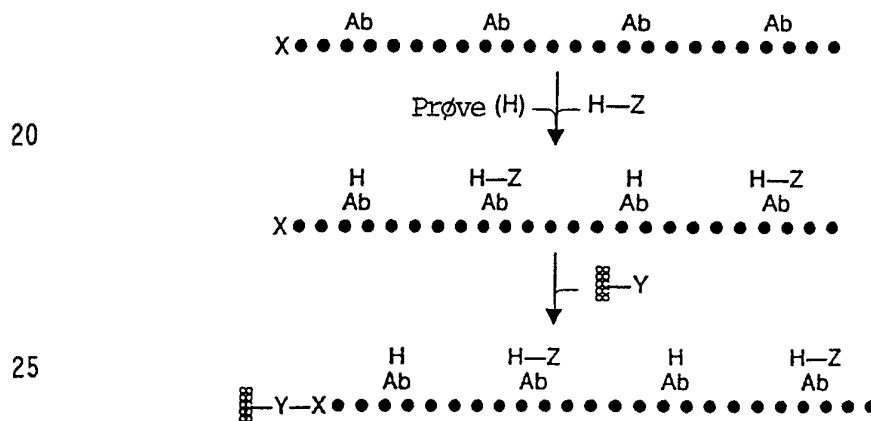
System III: Haptenpåvisning; Kompetitive analyser:

Ved haptenpåvisning fastgøres et specifikt antistof rettet mod en given hapten, som man ønsker at undersøge, kemisk til en opløselig, flydende matrix eller rygrad og mærkes derefter med en ligand.

5 En patientprøve, som mistænkes for at indeholde dette hapten, omsættes i væskefase med den opløselige matrix indeholdende det ligandmærkede specifikke antistof i nærværelse af en haptenmærket probe (H-Z) som afbildet nedenfor. Der sker en konkurrence mellem patienthaptenet og den mærkede haptenprobe for bindingssteder på det

10 ligandmærkede antistof i en given tidsperiode. Dette efterfølges af tilsætning af en immobiliseret anti-ligand på en fast bærer, hvilken anti-ligand er rettet mod den ligand, som er fastgjort til den opløselige matrix indeholdende det specifikke antistof. Den faste

15 fase vaskes og undersøges for tilstedeværelsen af den haptenmærkede probe, hvilket er omvendt proportional med koncentrationen af hapten i patientprøven.



Vask fast fase og undersøg for Z.

30 For visse haptener kan det være fordelagtigt at fæstne liganden direkte til det haptenspecifikke antistof uden at anvende en opløselig, flydende matrix for at undgå mulig sterisk hindring, hvis den haptenmærkede, signalfremkaldende probe har en høj molekylvægt, navnlig visse enzymmærkninger.

35 Anvendelsen af en opløselig, flydende matrix eller rygrad til fastgørelse af specifikke antigener eller antistoffer og efterfølgende mærkning af rygraden med en given ligand er den foretrukne udførelsesform for den foreliggende opfindelse. Variationer i fremgangsmåden eller sekvensen af fastgørelser til matrixen vil være indlysende for en fagmand.

Fremstilling af opløselig, flydende antigen- eller antistofmatrix

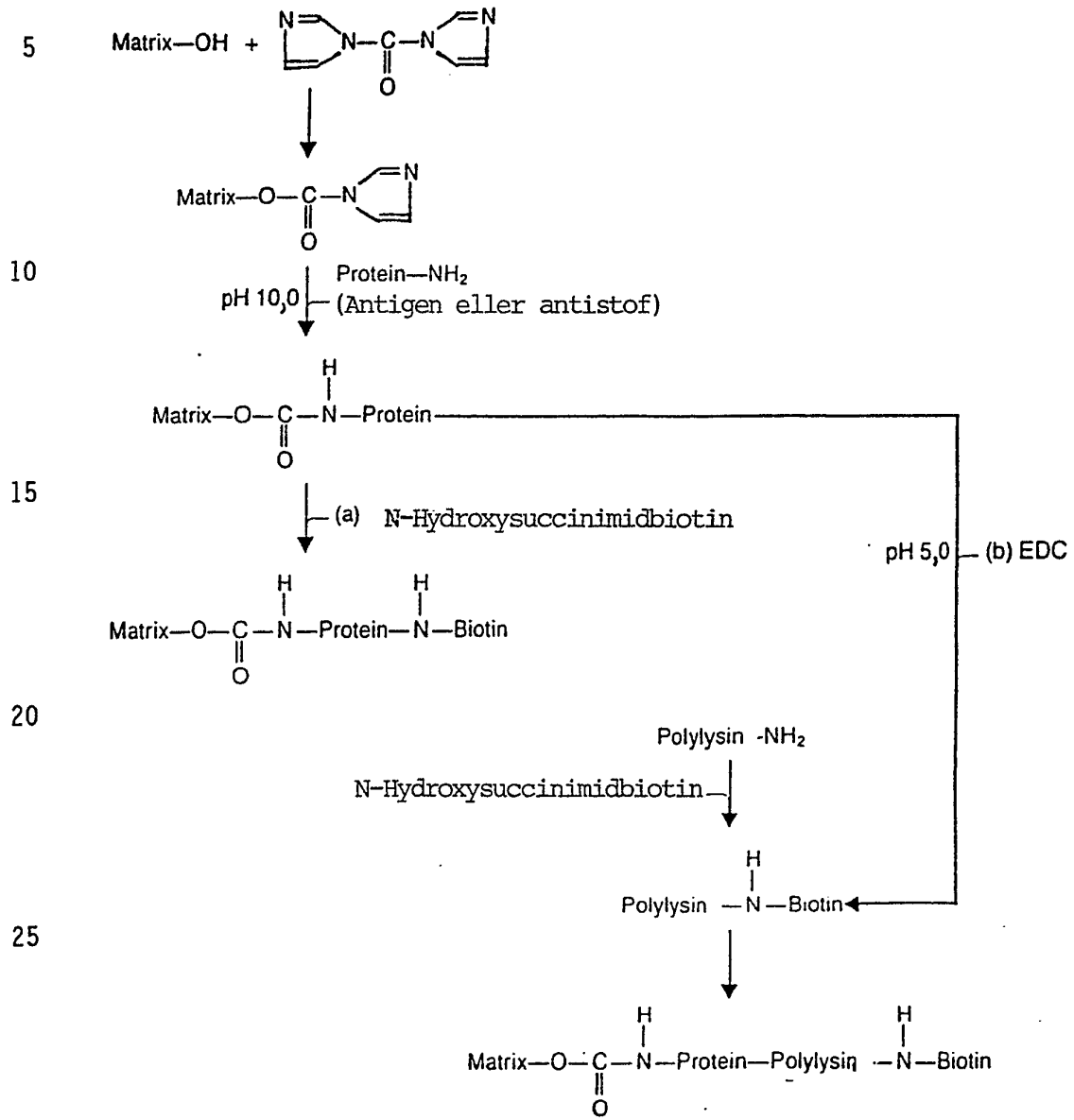
De efterfølgende reaktionssæt beskriver forskellige reaktionssystemer til fremstilling af opløselige matrixer eller rygrade indeholdende et givent antigen eller et givent antistof og en specifik ligand. I disse reaktionssæt aktiveres opløselige polymerer med forskellige forbindelser og omsættes ved forskellige mekanismer. De aktiverede polymermatrixer kobles enten direkte covalent med et antigen eller antistof eller indirekte med en polypeptidpolymer eller copolymer, hvortil et antigen eller antistof derefter covalent fastgøres. Matrix-antigenkomplekset eller matrixantistofkomplekset eller matrix-polypeptid/copolymer-antigenkomplekset eller matrix-polypeptid/copolymerantistofkomplekset mærkes derefter med en ligand direkte eller indirekte gennem en kæde tidligere mærket med ligand. Den ligand, som anvendes i disse eksempler, er biotin, og anti-liganden er avidin. For andre mulige ligand-anti-ligand-kombinationer henvises til afsnittet vedrørende andre mulige ligander.

Reaktionssystem 1

I denne reaktionssekvens anvendes to opløselige kulhydrater: (i) opløselig dextran med en molekylvægt, som varierer fra 6000 til 80.000 dalton, og (ii) opløselig Ficoll med en molekylvægt, som varierer fra 70.000 til 400.000 dalton. Disse to kulhydrater anvendes i de efterfølgende eksempler og forkortes MATRIX-OH. De aminosyrecopolymerer, som anvendes i de efterfølgende eksempler, kan udvælges blandt en række sådanne copolymerer, hvor eksempler herpå er (a) polylysin, phenylalanin, (b) polylysin, alanin (c) polyglutaminsyre, glutaminsyreester eller (d) polyglutaminsyre, alanin, lysin, tyrosin. Andre aminosyrecopolymerer vil være indlysende for en fagmand.

Reaktionssekvens Ia.

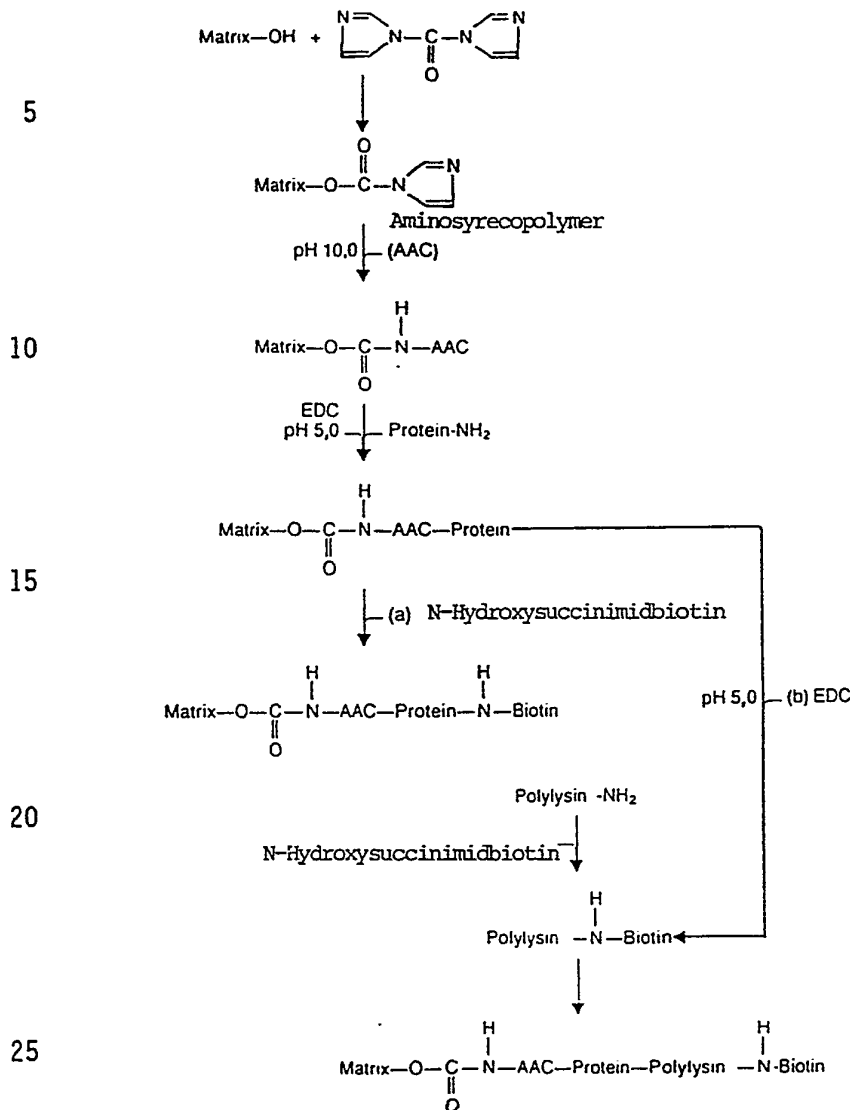
1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) aktivering og kobling.



\* EDC er N-ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid.

Reaktionssekvens 1b

Anvendelse af aminosyreco-polymer med CDI-reaktion.



De efterfølgende eksempler angives alene for at illustrere opfindelsen.

Eksempel 1

30 Fremstilling af Matrix indholdende specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 1b.

Ovennævnte CDI-aktiveringsreaktion, modificeret fra Bethell, G. et al., J.Biol.Chem. 254:2572(1979) blev anvendt til at fremstille specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 1b og er beskrevet her:

35 (i) 124 nM Matrix-OH, som beskrevet under reaktionssekvens 1, se ovenfor, blev opløst i 2,0 ml dimethylsulfoxid indeholdende 10,0 mg 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) og blev omsat ved omgivelsestemperatur i 30 minutter med hyppig rystning.

(ii) 770 nM aminosyre-copolymer (f.eks. glutaminsyre, ethylglutamat) opløst i 2,0 ml dimethylsulfoxid blev tilsat til reaktionsblandingen i (i) ovenfor og fik lov til at reagere i 24 timer ved omgivelsestemperatur under omrystning.

5 (iii) reaktionsblandingen fra (i) og (ii) ovenfor blev fortyndet med 2 volumener vand og blev kromatograferet på en Sepharcryl-300 søjle for at isolere Matrix-copolymer-komplekset.

(iv) Fraktioner indeholdende Matrix-copolymeren blev dialyseret mod destilleret vand og yderligere dialyseret mod acetatpuffer pH  
10 5,0.

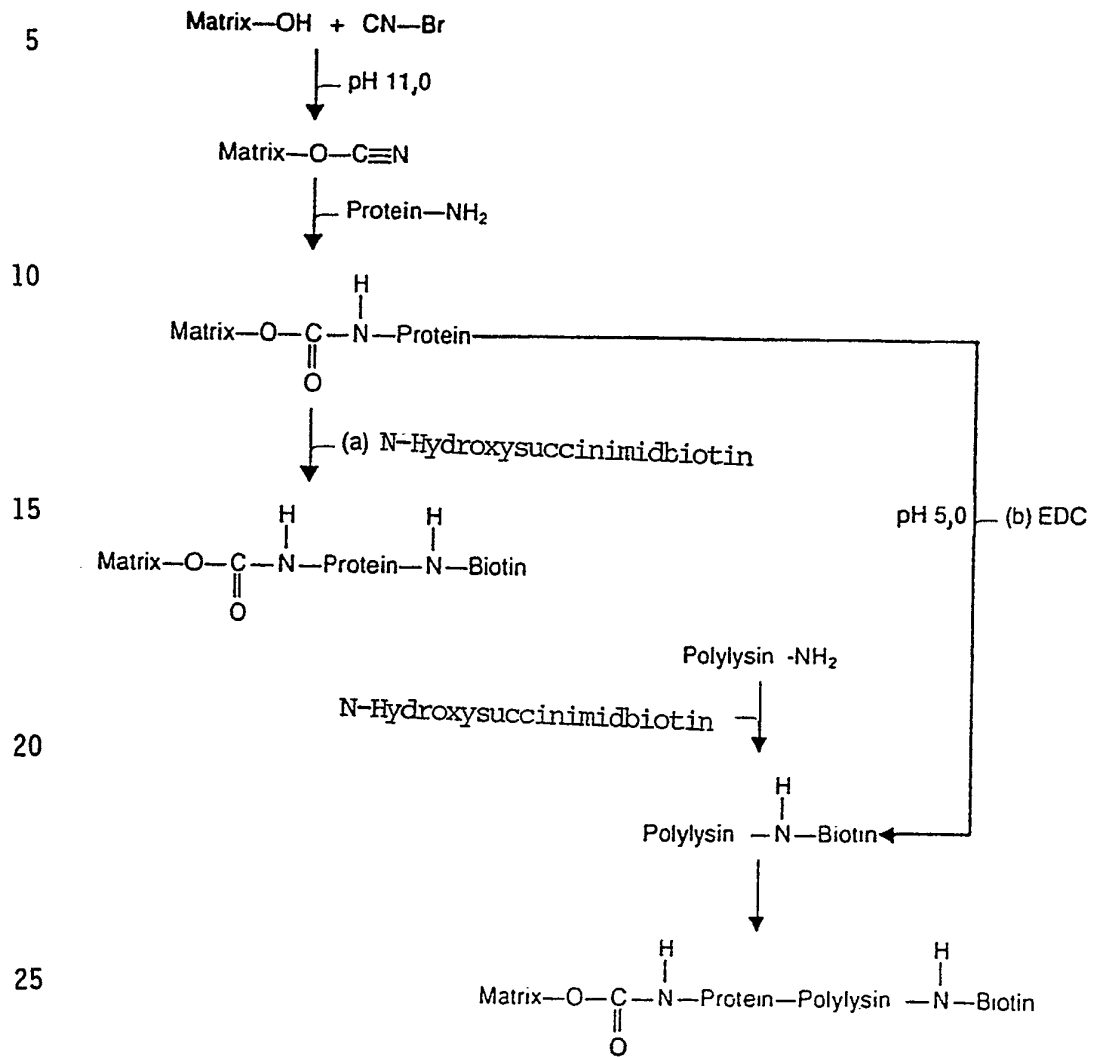
(v) Til det dialyserede Matrix-copolymer-konjugat tilsattes 20,0 mg frysetørret allergenekstrakt efterfulgt af tilsætningen af 0,15 M N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), og blandingen fik lov til at reagere i 24 timer ved 4°C under omrystning. Reaktionens pH-værdi blev holdt ved pH 5,0 under denne reaktionsperiode. Reaktionsblandingen blev derefter dialyseret mod 0,1 M natriumbicarbonatpuffer ved pH 8,1 i 12 timer ved 4°C.

(vi) Matrix-copolymer-allergen-konjugatet blev derefter yderligere omsat med 7,3 µM N-hydroxysuccinimidbiotin opløst i 1,0 ml dimethylformamid natten over ved 4°C. Den sidste reaktionsblanding blev kromatograferet på en Sephacryl-300 søjle, og fraktionerne svarende til Matrix-copolymer-allergen-biotin-konjugatet blev hældt sammen og undersøgt for allergenaktivitet, som angivet i detaljer nedenfor.

25 Alternativt blev ovennævnte reaktion modificeret, og biotinylet polylysin blev omsat med Matrix-copolymer-allergen-konjugatet i trin (vi) ovenfor på følgende måde: 1,8 µM polylysin (molekylvægt 3.800 dalton) og 180 µM N-hydroxysuccinimidbiotin blev opløst i 1,0 ml dimethylformamid og fik lov til at reagere i 4 timer ved omgivelsestemperatur. Det biotinylede polylysin blev kromatograferet på  
30 en CM-Sepharosesøjle og blev elueret med 50 mM natriumborat pH 9,0 indeholdende 2,0 M natriumchlorid. Det biotinylede polylysin-konjugat blev indstillet til pH 5,0 og omsat med Matrix-copolymer-allergen-konjugatet under anvendelse af EDC som beskrevet under (vi) og  
35 blev kromatograferet til frembringelse af Matrix-copolymer-allergen-polylysin-biotin-konjugatet.

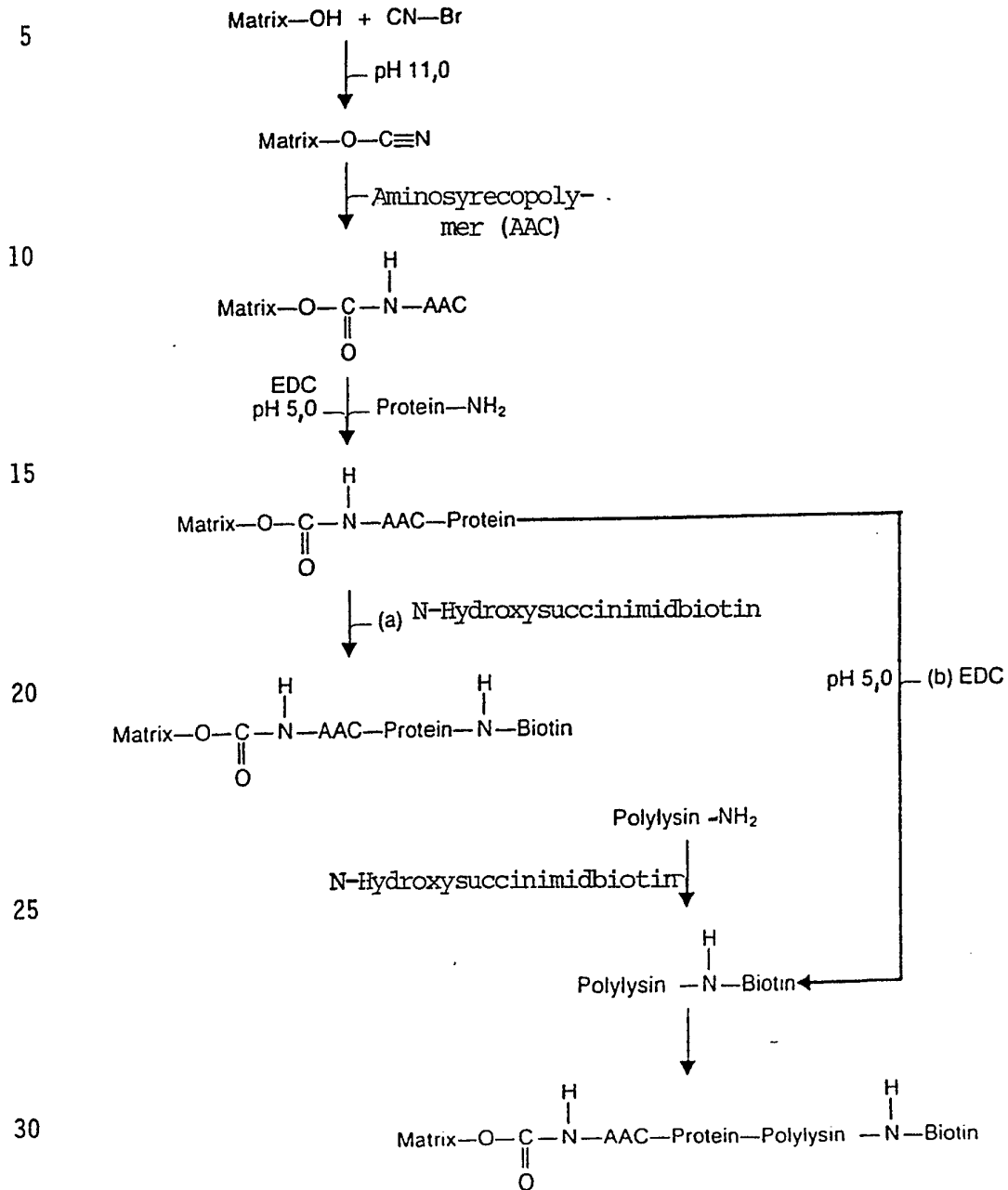
Reaktionssekvens 2a:

Cyanogenbromidaktivering og -kobling.



Reaktionssekvens 2b

Anvendelse af aminosyre copolymer (AAC) med cyanogenbromidreaktion.

Eksempel 2

35 Fremstilling af Matrix indeholdende specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 2b.

Ovennævnte cyanogenbromidaktiveringsreaktion, som er modificeret fra March, S. et al., Anal.Biochem. 60:149(1974), blev anvendt til fremstillingen af specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 2b og er beskrevet her:

(i) 124 nM Matrix-OH, som beskrevet under system 1, se ovenfor, blev opløst i 2,0 ml 2,0 M natriumcarbonat og blev omsat med 100  $\mu$ l cyanogenbromidopløsning (2g CNBr-krystaller opløst i 1,0 ml acetonitril) i 2 minutter ved pH 11,0 og blev yderligere omsat i endnu 2  
5 minutter med 100 ml af den samme cyanogenbromidopløsning.

(ii) Umiddelbart derefter tilsattes 385 nM aminosyreco-polymer til (i) ovenfor, og blandingen fik lov til at reagere natten over ved omgivelsetemperatur og under omrøring.

(iii) Reaktionsblandingen blev kromatograferet på en Sephacryl-  
10 300 søjle for at isolere Matrix-copolymer-konjugatet og blev yderligere dialyseret mod destilleret vand efterfulgt af dialyse mod acetatpuffer pH 5,0.

(iv) Til det dialyserede Matrix-copolymer-konjugat tilsattes 20 mg frysetørret allergenekstrakt og 0,15 M EDC, og blandingen fik lov  
15 til at reagere i 24 timer ved 4<sup>o</sup>C, medens reaktionsblandingsens pH-værdi blev holdt på 5,0. Dette blev efterfulgt af dialyse af reaktionsblandingen indeholdende Matrix-copolymer-allergen-konjugatet mod 0,1 M natriumbicarbonat pH 8,1 i 12 timer ved 4<sup>o</sup>C. Reaktionssekvensen her følger den, som er beskrevet i eksempel 1 ved  
20 reaktionstrin (vi). Den alternative reaktion, hvortil anvendes biotinyleret polylysin, er også den samme som i eksempel 1, se ovenfor.

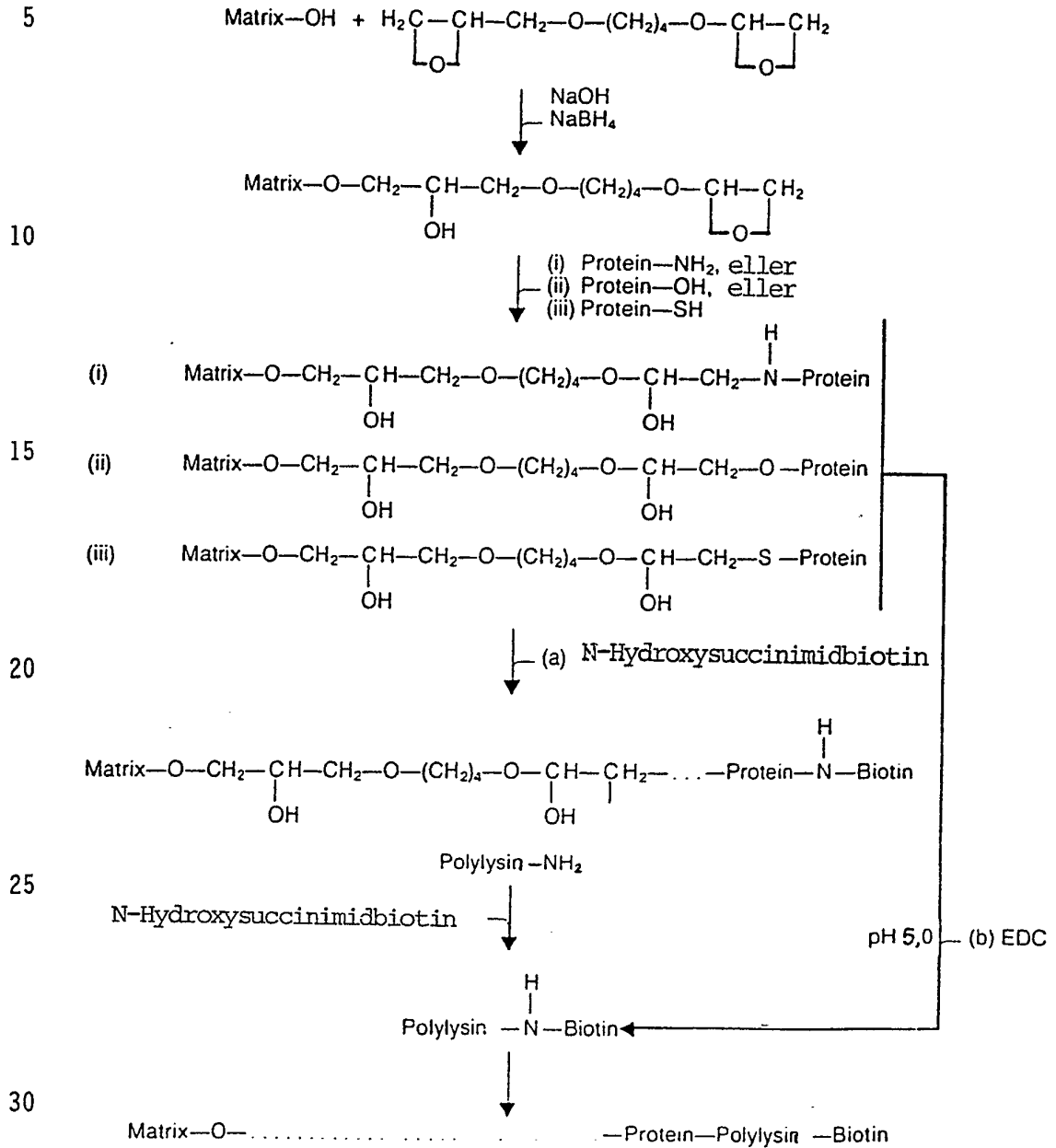
25

30

35

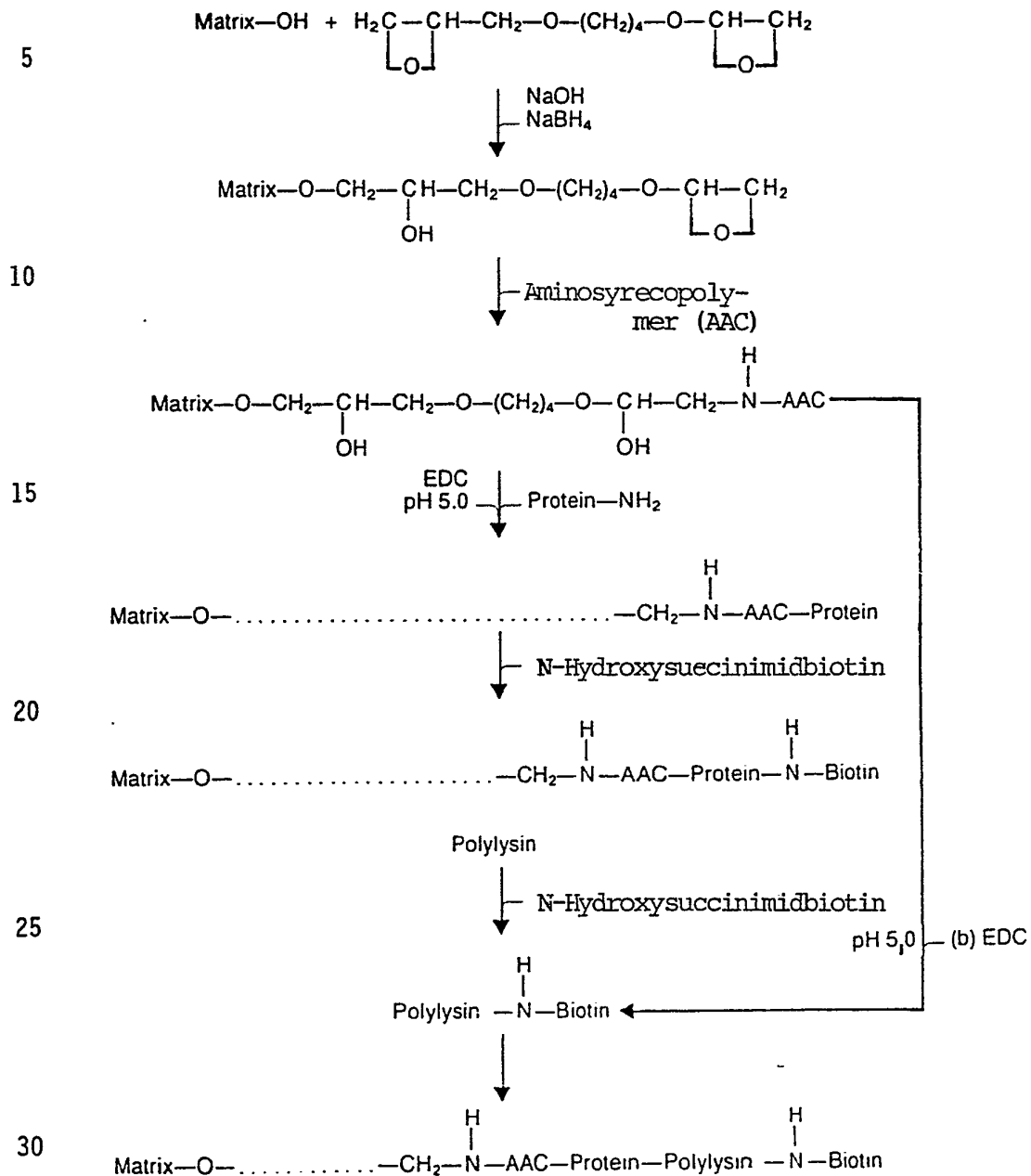
Reaktionssekvens 3a

1,4-Butandiol diglycidylether-(BDDGE)-aktivering og -kobling.



Reaktionssekvens 3b

Anvendelse af aminosyrecopolymer med BDDGE-reaktion.

Eksempel 3

Fremstilling af Matrix indeholdende specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 3b.

35 Ovennævnte BDDGE-aktiveringsreaktion, som er modificeret fra Sunberg, L. et al., J.Chromatography, 90:87 (1974), blev anvendt til fremstillingen af specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 3b og er beskrevet her:

(i) 150 nM Matrix-OH som beskrevet under reaktionssystem 1 blev

opløst i 4,0 ml 0,3 M natriumhydroxid indeholdende 0,26 mM natriumborhydrid og blev omsat med 2,7 mM 1,4-butandiol diglycidylether i 4 timer ved omgivelsestemperatur.

(ii) Til den aktiverede Matrix i (i) ovenfor tilsattes 600 nM  
5 aminosyre copolymer og blandingen blev yderligere omsat i 4 timer ved 4°C. Reaktionsblandingen blev derefter dialyseret mod destilleret vand og yderligere dialyseret mod acetatpuffer pH 5,0.

(iii) Til det fremkomne Matrix-copolymer-konjugat tilsattes  
10 20,0 mg frysetørret allergenekstrakt og 0,15 M EDC som i reaktionsstrin (v). Reaktionssekvensen følger den fra eksempel 1 ved reaktionstrin (vi). Den alternative sekvens med biotinylet polylysin er også den samme som i eksempel 1, se ovenfor.

15

20

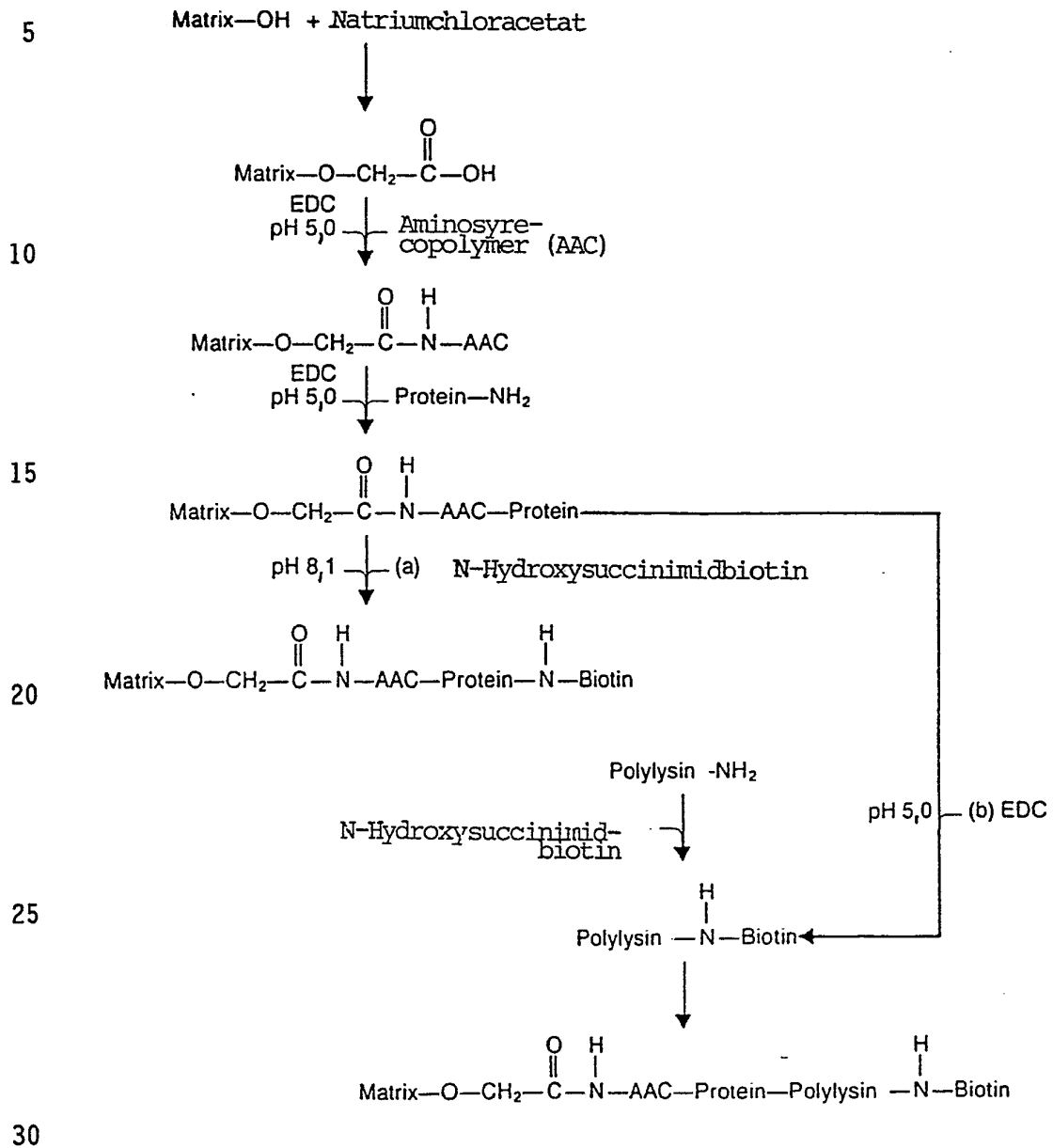
25

30

35

Reaktionssekvens 4

## Carboxymetyleringsreaktion.

Eksempel 4

Fremstilling af Matrix indeholdende specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 4:

35 Carboxymetyleringsaktiveringsreaktionen, som er modificeret fra Inman, J.J.Immunol. 114:704 (1975), blev anvendt til fremstilling af specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 4 og som beskrevet her:

(i) 0,33  $\mu$ M Matrix-OH, som beskrevet under reaktionssystem 1, blev opløst i 0,32 ml 1,35 M natriumchloracetat (300 ml destilleret

vand + 135 ml 5M natriumhydroxid + 64,4 g chloreddikesyre; pH indstillet til 6,0 og slutvoluminet indstillet til 500 ml med destilleret vand. Denne blanding blev blandet nogle få minutter med kraftig omblanding.

5 (ii) 86  $\mu$ l 10 M natriumhydroxid blev tilsat, og voluminet blev indstillet til 0,43 ml med destilleret vand, og blandingen fik lov til at reagere i 3 timer ved 40°C.

10 (iii) 17,2  $\mu$ l 2,0 M monobasisk natriumphosphat blev tilsat til reaktionsblandingen, som blev titreret til pH 7,0 under anvendelse af 0,1 M saltsyre. Den aktiverede Matrix blev derefter dialyseret mod destilleret vand efterfulgt af yderligere dialyse mod acetatpuffer pH 5,0.

15 (iv) Carboxymethyl-matrixen blev derefter omsat med 770 nM aminosyrecopolymer i nærværelse af 0,15 M EDC ved pH 5,0 i 24 timer ved 4°C. Reaktionsblandingen blev derefter dialyseret mod destilleret vand efterfulgt af dialyse mod acetatpuffer pH 5,0.

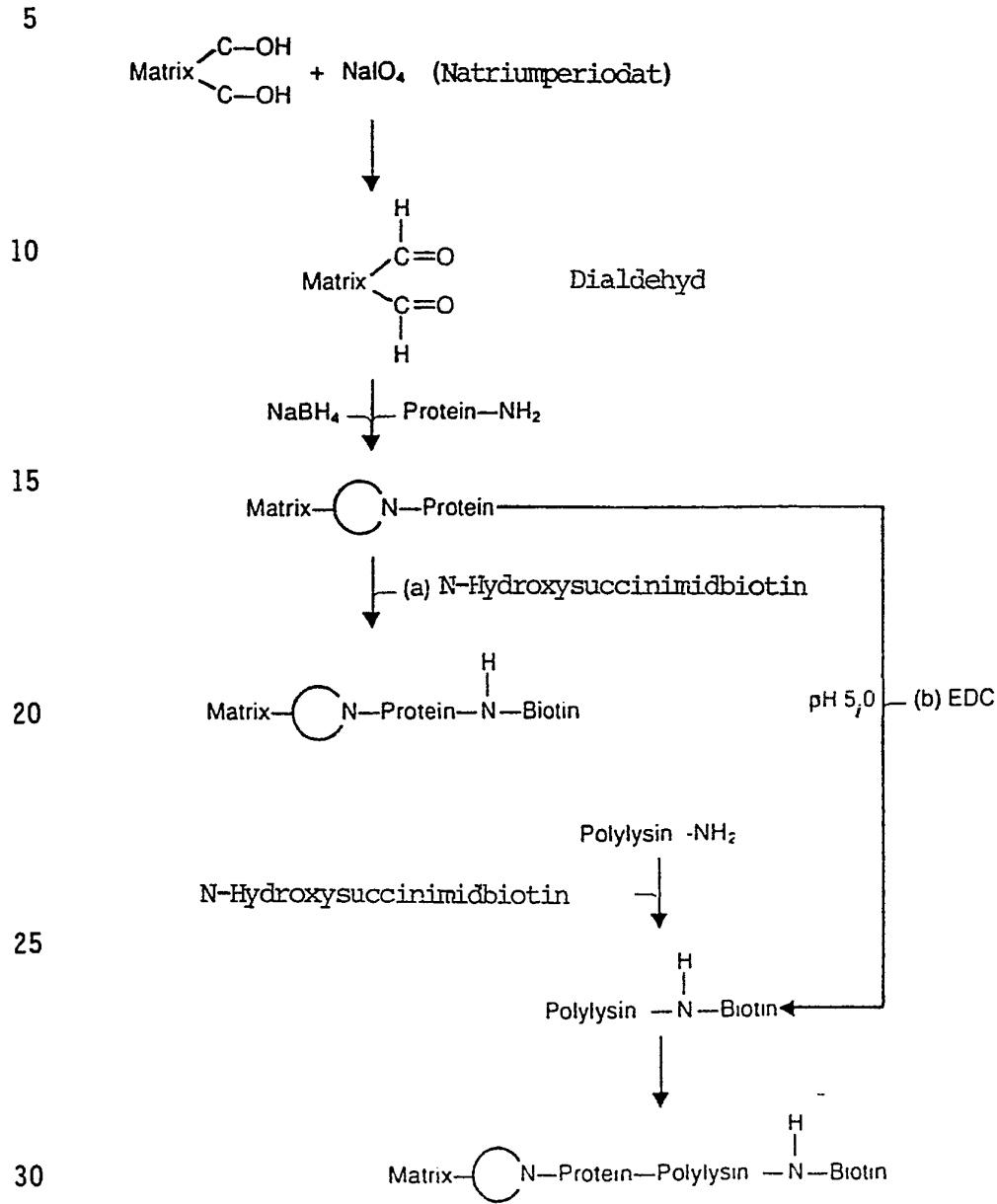
20 (v) 20 mg frysetørret specifik allergen blev tilsat sammen med 0,15 M EDC til Matrix-copolymer-konjugatet i trin (iv) og fik lov til at reagere som i eksempel 1 reaktionstrin (v). Reaktionssekvensen følger sekvensen fra eksempel 1 reaktionstrin (vi), og den alternative reaktion under anvendelse af biotinylet polylysin er den samme som i eksempel 1, se ovenfor.

25

30

35

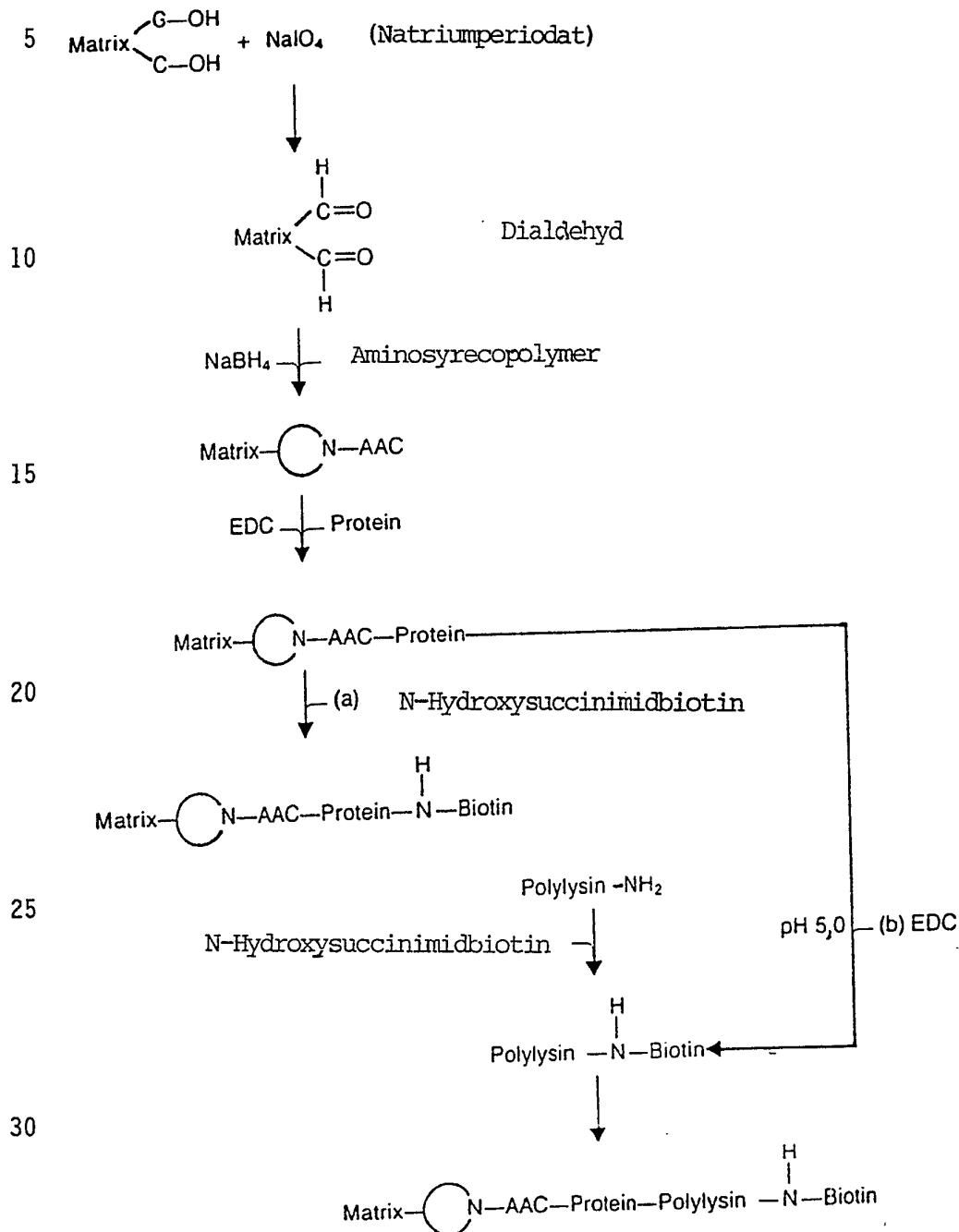
Reaktionssekvens 5a  
Periodatreaktion



35

Reaktionssekvens 5b

Under anvendelse af aminosyrecopolymer med periodatreaktion.

Eksempel 5

35 Fremstilling af Matrix indeholdende specifikke allergener under anvendelse af reaktionssekvens 5:

Ovennævnte periodataktiveringsreaktion, som er modificeret fra Nakane, P. et al., J.Histochem.Cytochem. 22:1084 (1974), blev anvendt til fremstilling af specifikke allergener under anvendelse

af reaktionssekvens 5b og er beskrevet her:

(i) 124 nM Matrix-OH som beskrevet under reaktionssystem 1 blev opløst i 0,3 M natriumbicarbonat ved pH 8,1 og blev omsat med 1,0 ml 0,2 M natriumperiodat i 1 time ved omgivelsestemperatur.

5 (ii) 500 nM aminosyrecopolymer blev tilsat, og blandingen blev omsat i 150 minutter ved omgivelsestemperatur. Der blev tilsat 0,26 mM natriumborhydrid for at stabilisere den Schiff'ske base.

(iii) Matrix-copolymer-konjugatet blev dialyseret mod destileret vand og blev yderligere dialyseret mod acetatpuffer pH 5,0.  
10 Reaktionssekvensen følger derefter de samme trin som i eksempel 1 reaktionstrin (v) til reaktionstrin (vi), og den alternative reaktion med biotinylet polylysin følger den fra eksempel 1, se ovenfor.

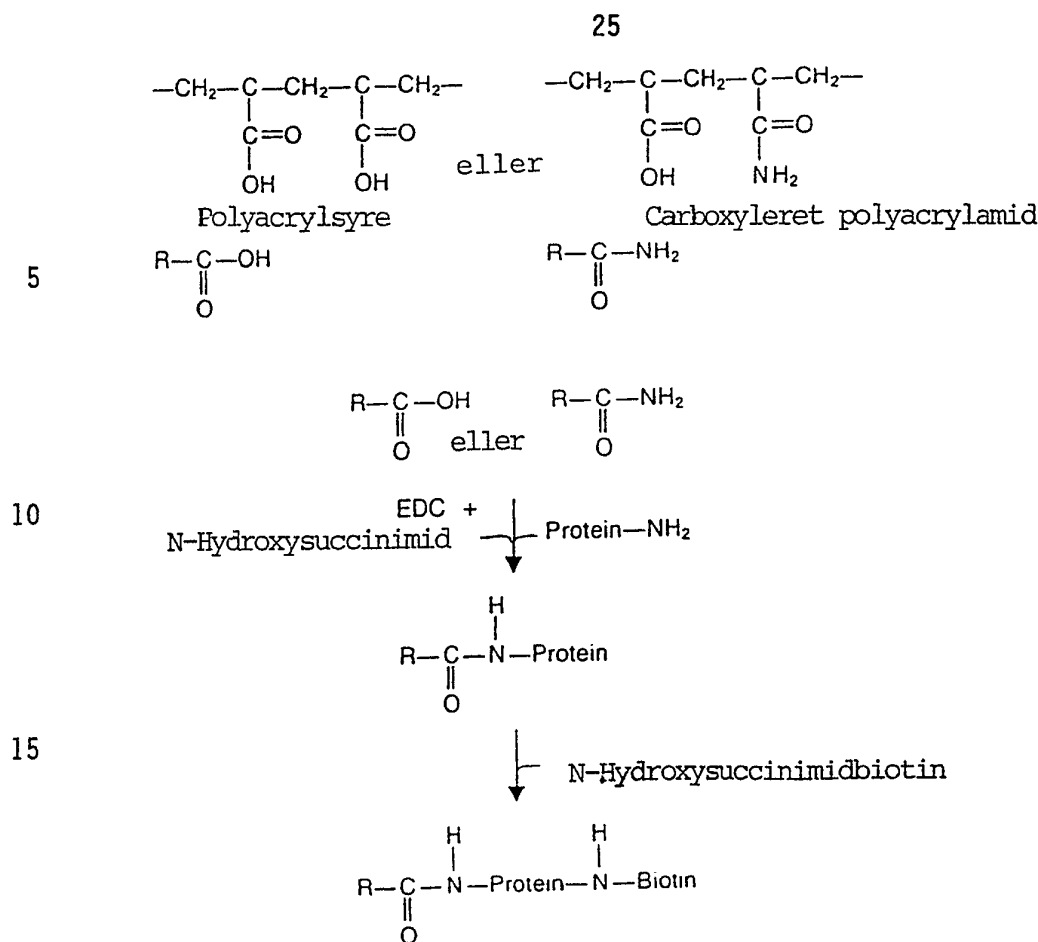
15 Reaktionssystem II:

Der anvendes opløselige polymerer i dette reaktionssystem: (i) polyacrylsyre med en molekylvægt, som varierer fra 5000 til 120.000 dalton, (ii) 50% til 100% carboxyleret polyacrylamid med en molekylvægt, som varierer fra 120.000 til 240.000 dalton og (iii) polypeptider eller copolymerer, som udviser reaktive carboxylgrupper, og  
20 som varierer med en molekylvægt på fra 5000 til 200.000 dalton. Reaktionssekvensen for disse former af polymerer og copolymerer ligner hinanden.

25

30

35



### Eksempel 6

Fremstilling af Matrix indeholdende specifikke allergener under anvendelse af reaktionssystem II.

(i) 0,033 nM polyacrylsyre eller carboxyleret polyacrylamid blev opløst i 2,0 ml 0,01 M fosfatpuffer pH 8,0. 0,1 M af hver af EDC og N-hydroxysuccinimid blev tilsat til polymeropløsningen efterfulgt af tilsætningen af 10,0 mg frysetørret specifik allergenekstrakt, og blandingen blev inkuberet i 24 timer ved omgivelsestemperatur under opretholdelse af pH-værdien på 8,0.

(ii) Polymer-allergen-konjugatet blev kromatograferet på en Sephadex G-100 søjle og blev elueret med 0,01 M fosfatpuffer pH 7,5, og eksklusionsvolumenet blev opsamlet.

(iii) Det opsamlede eksklusionsvolumen blev koncentreret til 2,0 ml ved centrifugal fordampning og blev omsat med 0,73 mM N-hydroxysuccinimidbiotin i 2 timer ved omgivelsestemperatur.

(iv) Polymer-allergen-biotin-konjugatet blev dialyseret mod 0,01 M fosfatpuffer pH 7,5 i 18 timer ved 4°C.

Valg af ligand- og anti-ligand-konfiguration:

Specifikke ligander og deres anti-ligandmodparter, som kan anvendes i forbindelse med den foreliggende opfindelse, udvælges fra en mængde forskellige forbindelser. De viste eksempler er kun  
 5 illustrative, og anvendelsen af en hvilken som helst anden kombination af ligand og anti-ligand vil være indlysende for en fagmand.

	<u>Ligand</u>	<u>Anti-ligand</u>
	Hapten	Anti-hapten
10	Biotin	Avidin
	Fluorescein	Anti-fluorescein
	Dinitrophenol	Anti-dinitrophenol
	Avidin	Anti-avidin
	Biotin	Anti-biotin
15	Bovinserumalbumin	Anti-bovinserumalbumin.

I forbindelse med ovennævnte eksempler på ligander og anti-ligander udføres den her beskrevne reaktionssekvens i en reaktionsbeholder, f.eks. et reagensglas, derefter indføres  
 20 fastfasebærematerialet indeholdende anti-liganden i den samme reaktionsbeholder. Fastfasebærematerialet kunne i dette tilfælde være belagte kugler, dipstick og lignende.

Det er undertiden ønskeligt at anvende et fastfasebæremateriale i form af et coated reagensglas, eftersom det er let at håndtere og vaske. I dette tilfælde kan den ovennævnte konfiguration være  
 25 uegnet, eftersom den første reaktion udføres i væskefase efterfulgt af en fasefaseseparation. Hvis man ikke trakter efter en første væskefasereaktion, så er ovennævnte kombinationer af ligander og anti-ligander egnede ved fremstillingen af en fastfasematrix som her beskrevet. Hvis man på den anden side trakter efter en første  
 30 reaktion i væskefase, og hvis begge reaktioner skal udføres i den samme reaktionsbeholder, såsom f.eks. et coated reagensglas, kan der anvendes adskillige mulige konfigurationer ved en sådan applikation:

(1) Liganden fastgjort til den flydende matrix er avidin, og  
 35 det fastfasecoatede reagensglas er coated med avidin. For at effektivere immobiliseringen af immunokompleksmatrixen indeholdende avidin på det avidincoatede reagensglas tilsættes biotin efter at den initiale væskefasereaktion er blevet afsluttet. Dette vil danne følgende immobiliserede kompleks:

MATRIX .....Avidin-Biotin-Avidin - IX  
som vist i systemerne I og II, se ovenfor.

(2) Ved at biotynlere den flydende matrix som beskrevet tidligere og anvende et anti-avidin-antistof på det fastfasecoatede reagensglas kan immobilisering af førstnævnte på sidstnævnte opnås  
5 ved efter den initielle væskefasereaktion at tilsætte avidin til reaktionsblandingen, som vil bindes til både anti-avidin-antistoffet og den biotynlerede flydende immunokompleksmatrix. Dette vil danne følgende immobiliserede kompleks:

10 MATRIX .....Biotin-Avidin-Anti-Avidin- IX

(3) Ved at biotynlere den flydende matrix som beskrevet tidligere og anvende et reagensglas coated med biotynleret protein, såsom bovinserumalbumin, kan immobilisering af førstnævnte på sidstnævnte opnås ved at tilsætte avidin til reaktionsbeholderen  
15 efter at den initielle væskefasereaktion har fundet sted. Dette vil danne følgende immunokompleks på den faste fase:

MATRIX .....Biotin-Avidin-Biotin-BSA - IX  
Andre mulige kombinationer er indlysende for en fagmand.

#### Eksempel 7

20 Bestemmelse af cirkulerende total IgE (reagin-immunoglobuliner) ifølge den foreliggende opfindelse:

Der blev rejst to forskellige monoklonale antistoffer mod oprenset IgE og som genkendte to forskellige epitoper på IgE-molekylet under anvendelse af metoden ifølge Galfre, G. og Milstein, C.  
25 (Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures. I "Method of Enzymology", Immunochemical Techniques, bd.73, Langone, J. og van Vunakis, H., red. Academic Press (1981) s.3-46).

IgG-fraktionen fra hvert antistof blev oprenset på DEAE-Sepharose CL-6B efter ammoniumsulfatpræcipitering. Et antistof blev konjugeret til peberrodperoxidaseenzym under anvendelse af periodatmetoden ifølge Nakane, P. et al., J.Histochem.Cytochem. 22:1084  
30 (1974) og blev fortyndet til en arbejdsopløsning i 0,05 M fosfatpuffer pH 7,0 indeholdende 0,15 M natrimchlorid, 0,01% thimerosal og 0,1% human serumalbumin. Det andet monoklonale antistof mod IgE blev fæstnet til polyacrylsyre og blev biotynleret som beskrevet under reaktionssystem II, eksempel 6, se ovenfor, under anvendelse af 2,94 nmol oprenset IgG i stedet for det specifikke allergen som beskrevet i eksempel 6. Polyacrylsyre-anti-IgE-biotin-komplekset blev fortyndet til en arbejdsopløsning i samme puffer som den ovenfor beskrevne

enzymmærkning.

Avidin blev passivt immobiliseret på 0,3 cm polystyrenkugler under anvendelse af metoden ifølge Catt, K. og Tregear, G.W., Science 158:1570 (1967) og blev frysetørret for at fjerne overskydende fugt.

Standarder, som havde IgE-værdier på fra 10 til 600 internationale enheder pr. ml, blev fremstillet i hesteserum og blev standardiseret mod den 2. internationale referencepræparation for human serum-IgE, nr.75/502 fra World Health Organization.

Total cirkulerende IgE i 30 tilfældigt valgte serumprøver blev bestemt på følgende måde:

10  $\mu$ l af hver af IgE-standarderne inklusiv en 0-standard og 10 ml af hver serumprøve blev pipetteret i et 12x75 mm reagensglas. Til hvert reagensglas tilsattes 100  $\mu$ l af polyacrylsyre-anti-IgE-biotin-komplekset og 100  $\mu$ l af det enzymmærkede, monoklonale anti-IgE-antistof, og reagensglassene blev kort omblandet og inkuberet i 30 minutter ved omgivelsestemperatur. Efter denne initielle inkubering blev 1 avidincoated kugle tilsat til hvert reagensglas, og alle reagensglas blev yderligere inkuberet i 30 minutter under omrystning ved omgivelsestemperatur. Kuglerne blev derefter vasket to gange med den samme puffer, som blev anvendt til de monoklonale antistoffer, men indeholdende 0,5% Tween-20, og blev omsat 10 minutter med 0,5 ml enzymsubstrat indeholdende 3,5 mg hydrogenperoxid og 5,0 mg o-phenylendiamin i 0,1 M citrat-phosphatpuffer pH 5,0. Farvereaktionen blev stoppet ved at tilsætte 0,5 ml 0,5 M svovlsyre, og farveabsorbansen blev bestemt på et spektrofotometer ved en bølgelængde på 492 nm. Absorbansen for hvert punkt på standardkurven er opstillet herefter:

	<u>IgE Int.enheder/ml</u>	<u>Absorbans</u>
30	0	0,010
	10	0,051
	30	0,106
	100	0,313
	300	0,809
35	600	1,370

IgE-koncentrationen i hver af de 30 serumprøver blev beregnet ud fra ovennævnte standardkurve og blev sammenlignet med IgE-koncentrationen bestemt i prøven under anvendelse af Pharmacia's total

IgE enzymanalyse (Pharmacia Inc., Piscataway, N.J.) med følgende regressionsresultater:

Gennemsnit Pharmacia: 89 int.enheder/ml.

Gennemsnit for den foreliggende metode: 88 int.enheder/ml.

5 Foreliggende metode = 1,04 Pharmacia - 2,7 int.enheder/ml.

Korrelationskoefficient = 0,9690.

#### Eksempel 8

Bestemmelse af IgE-specifikke allergener under anvendelse af den foreliggende opfindelse:

10 Bestemmelsen af IgE-specifikke allergener blev udført under anvendelse af udførelsesformerne ifølge den foreliggende opfindelse og blev analyseret ifølge følgende protokol:

200  $\mu$ l Matrix-allergen-biotin eller Matrix-allegen-AAC-biotin eller Matrix-allergen-AAC-polylysin-biotin i 0,05 M fosfatpuffret  
 15 salin pH 7,0 som beskrevet i eksempel 7 ovenfor blev tilsat til 100  $\mu$ l patientserum eller en atopisk kalibrator og fik lov til at reagere i 2 timer ved omgivelsestemperatur. Der blev tilsat 1 avidincoated kugle til hvert reagensglas, og reaktionen fik lov til at fortsætte i 60 minutter ved omgivelsestemperatur på en mekanisk  
 20 omryster sat ved 200 slag pr.minut. Kuglerne blev vasket to gange som beskrevet i eksempel 7 ovenfor og blev omsat i endnu 60 minutter ved omgivelsestemperatur med 300  $\mu$ l peberrodperoxidaseenzymmærket gedeanti-IgE fortyndet i samme puffer som ovenfor. Kuglerne blev genvasket to gange og yderligere omsat i 20 minutter med 300  $\mu$ l  
 25 enzymsubstrat som beskrevet i eksempel 7 ovenfor, og reaktionen blev standset med 0,5 ml 0,5 M svovlsyre, og farveabsorbansen blev målt ved 492 nm.

Følgende resultater blev opnået med en udvalgt gruppe allergener fastgjort til forskellige matrixer som beskrevet i reaktionssystemerne I og II, se ovenfor.  
 30

#### (a) Timotegræs, G6:

Oprenset timote-græs (G6) blev fastgjort til (i) Ficoll 70 ved hjælp af polyglutaminsyre, glutaminsyreester som beskrevet i eksempel 1 i reaktionssekvens 1b, (ii) polyacrylsyre (PAA) som beskrevet  
 35 i eksempel 6 og (iii) carboxyleret polyacrylamid (CPA) som beskrevet i eksempel 6. En klasse IV, atopisk serum for G6 som klassificeret ved Phadebas-RAST-kit fra Pharmacia (Piscaway, N.J.) blev fortyndet i et ikke-atopisk serum for at simulere de atopiske klasser III, II og I og blev analyseret under anvendelse af ovennævnte protokol

sammen med 4 andre atopiske prøver og 1 ikke-atopisk prøve med følgende resultater til følge:

MATRIX	Ficoll 70	PAA	CPA
5	Absorbans		
Klasse IV	1,660	1,630	1,765
Klasse III	0,403	0,500	0,557
Klasse II	0,157	0,174	0,252
Klasse I	0,091	0,087	0,121
10 Ikke-atopisk serum	0,041	0,020	0,035
Patient nr.			
1	1,783	2,878	2,753
2	0,534	0,637	0,955
15 3	1,036	1,232	1,163
4	0,434	0,441	0,409

b) Birke træ:

Oprensset birke træallergen ekstrakt (T3) blev fastgjort til (i) 20 Ficoll 70 ved hjælp af aminosyre copolymeren polylysin, phenylalanin som beskrevet i eksempel 1 under anvendelse af reaktionssekvens 1b, se ovenfor, (ii) dextran 80 ved hjælp af polyglutaminsyre, alanin, lysin, tyrosin-copolymer som beskrevet i eksempel 2 under anvendelse af reaktionssekvens 2b, se ovenfor, og (iii) carboxyleret polyacrylamid (CPA) som beskrevet i eksempel 6 i reaktionssystem II, se 25 ovenfor.

En klasse IV atopisk serum for T3 klassificeret ved hjælp af Phadebas-RAST-kit fra Pharmacia blev fortyndet med en ikke-atopisk serum for at simulere de atopiske klasser III, II og I og blev ana- 30 lyseret under anvendelse af ovennævnte protokol sammen med to atopiske sera og en ikke-atopisk serum for T3 med følgende resultater:

MATRIX	Ficoll 70	Dextran 80	CPA
Absorbans			
Klasse IV	1,066	1,126	2,430
5 Klasse III	0,239	0,242	0,979
Klasse II	0,105	0,112	0,313
Klasse I	0,075	0,082	0,178
Ikke-atopisk serum	0,045	0,062	0,026
10 Patient nr.			
1	0,732	1,317	1,041
2	0,571	1,102	1,990

Valget af matrix, copolymer og reaktionssystem og -sekvens, som skal anvendes for et bestemt allergen, vil afhænge af proteinindholdet i hvert allergen og vil være indlysende for en fagmand.

Det er hensigten, at den beskrevne opfindelse kun skal begrænses af den lovbestemte rækkevidde af de tilhørende krav.

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til måling af niveauet af et antigen ( $Ag_1$ ), antistof ( $Ab_1$ ) eller haptent (H) i en flydende prøve, k e n d e t e g n e t ved, at der i en væskefasereaktion dannes et opløseligt kompleks, hvori antigenet ( $Ag_1$ ), antistoffet ( $Ab_1$ ) eller haptent (H) er bundet gennem henholdsvis et specifikt antistof (Ab), antigen (Ag) eller antihaptent (anti-H) til en matrix, som er opløselig i væskefasen og bærer en ligand (X), og at der derefter dannes et uopløseliggjort kompleks, som omfatter en fast bærer bundet til liganden (X) af det opløselige kompleks gennem en anti-ligand (Y), hvor det uopløseliggjorte kompleks bærer et mærke (Z), som er bundet til antigenet ( $Ag_1$ ) via et anti-antigen (anti- $Ag_1$ ), til antistoffet ( $Ab_1$ ) via et anti-antistof (anti- $Ab_1$ ) eller til haptent (H), at det uopløseliggjorte kompleks vaskes, og at det vaskede uopløseliggjorte kompleks undersøges for tilstedeværelse af mærket (Z) for at tilvejebringe et mål for niveauet af antigen ( $Ag_1$ ), antistof ( $Ab_1$ ), eller haptent (H) i prøven.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at mærkningen er en enzymmærkning eller en radioaktiv mærkning eller en fluorescerende forbindelse eller en kemiluminiserende forbindelse eller en bioluminiserende forbindelse eller et enzymsubstrat.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at en prøve indeholdende antigen ( $Ag_1$ ) eller antistof ( $Ab_1$ ) omsættes med et ligandmærket (X), specifikt antigen (Ag) eller et ligandmærket (X), specifikt antistof (Ab) anbragt på en matrix, at denne matrix derefter kontaktes med en på en fast bærer immobiliseret anti-ligand (Y), at den faste bærer vaskes og omsættes med et anderledes mærket anti-antigen (anti-Ag-Z) eller anti-antistof (anti- $Ab_1$ -Z), at den faste bærer genvaskes og undersøges for tilstedeværelsen af mærkning (Z) knyttet til anti-antigenet (Anti-Ag) eller anti-antistoffet (Anti- $Ab_1$ ).

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at mærkningen er en enzymmærkning eller en radioaktiv mærkning eller en fluorescerende forbindelse eller en kemiluminiserende forbindelse eller en bioluminiserende forbindelse eller et enzymsubstrat.

5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 til 4, k e n d e t e g n e t ved, at en prøve omsættes med en matrix bærende en ligand (X) specifikt antihaptent (anti-H) i nærværelse af en haptentmærket probe (H-Z), at kompetitiv binding får lov til at finde sted

mellem prøvehaptenet (H) og den haptænmarkede probe (H-Z) for antihaptæn (anti-H) bindingssteder på den ligandmarkede matrix i en given tidsperiode, at det efterfølges af tilsætning af et på en fast bærer immobiliseret anti-ligand (Y) rettet mod den ligand (X), som er bundet til det specifikke antihaptæn (anti-H), at den faste fase vaskes, og at tilstedeværelsen af den haptænmarkede probe (H-Z) undersøges.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at mærkningen er et enzym eller et radioaktivt grundstof eller en fluorescerende forbindelse eller en kemiluminiserende forbindelse eller en bioluminiserende forbindelse eller et enzymsubstrat.

15

20

25

30

35