



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) 172517

(13) B

(51) Int Cl⁵ G 01 N 33/53, 33/543, 33/58, 33/74

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	881241	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	06.08.87, PCT/GB87/00558
(22) Inng. dag	21.03.88	(85) Videreføringsdag	21.03.88
(24) Løpedag	06.08.87	(30) Prioritet	06.08.86, GB, 8619206
(41) Alm. tilgj.	21.03.88		06.08.87, EP, 87306995
(44) Utlegningsdato	19.04.93		

(71) Patentsøker Roger Philip Ekins, Middlesex Hospital Med. School, Mortimer Str., London, England, GB

(72) Oppfinner Søkeren

(74) Fullmektig Jan Helgerud, Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** Immunoanalyse for bestemmelse av analyttkonsentrasjon i en væskeprøve og sett for gjennomføring av fremgangsmåten

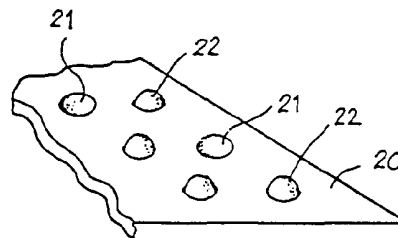
(56) **Anførte publikasjoner** WO 80/02076, 84/01031.

(57) **Sammendrag**

For å måle konsentrasjonen av en analytt i en flytende prøve blir prøven bragt i kontakt med et reseptormolekyl med bindingssteder for analytten og merket med en første markør, hvorved en andel av bindingssetene for reseptormolekylet opptas av analytten, prøven bringes i kontakt med en så liten mengde reseptor med henblikk på affinitetskonstanten med analytten at kun en ubetydelig andel av analytten blir bundet til reseptoren. Reseptoren med delvis opptatte bindingssteder blir så tilbaketitrert ved hjelp av en tilbaketitreringsteknikk som involverer et system inkludert en andre markør som er forskjellig fra den første, og der de relative styrker av de to signaler som avgis av de to markører måles for å tilvelebringe en verdi som er representativ for den fraksjonelle opptatthet av bindingssetene på reseptormolekylet, av analytten.

Denne verdi sammenlignes med en eller flere tilsvarende verdier oppnådd på samme måte ved bruk av en eller flere standard væskeprøver med kjent analyttkonsentrasjon.

En analyttisk innretning som egner seg for gjennomføring av denne fremgangsmåte omfatter et langstrakt fast substrat (20) med et antall i avstand anordnede lokaliseringer (21) av et antall forskjellige reseptorer (22), hver med bindingssteder på molekylet for en analytt, idet reseptoren på en hvilken som helst lokalisering har bindingssteder som er spesifikke for en analytt forskjellig fra den analytt for hvilken reseptoren på en eller flere andre lokaliseringer har spesifikke bindingssteder, hvorved hver av reseptorene eventuelt er merket med en markør. Denne innretning kan gjennomføres som en del av et sett for gjennomføring av den ovenfor beskrevne fremgangsmåte.



Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for bestemmelse av konsentrasjonen av analytter i væsker ved bruk av to forskjellige merkede markører ved immunoanalyse eller immunometriske teknikker, oppfinnelsen angår også et sett for gjennomføring av fremgangsmåten.

Det er kjent å måle konsentrasjonen av en analytt som et medikament eller et hormon i en væske, ved å eksponere væsken til en reseptor med bindingssteder på molekylet for analytten, separering av den reseptorholdige bundne analytt fra væsken, måling av en verdi som er representativ for andelen tilgjengelige bindingssteder på reseptormolekylet som opptas av analyttmolekylene (kalt den fraksjonelle okkupasjon) og sammenligning av denne verdi med en tilsvarende målt verdi oppnådd med en oppløsning med kjent konsentrasjon, av analytten.

Målingene av den angjeldende verdi kan oppnås ved en tilbaketitreringsteknikk som involverer kontakt mellom reseptormolekylholdig bundet analytt med en merket versjon av analytten. Det er også mulig i stedet for en merket analytt å benytte et annet merket materiale i stand til å innta kun de av analyttbindingssetene på reseptormolekylet som ikke virkelig opptas av analytten selv. Disse to systemer kalles kompetitive systemer fordi den merkede analytt eller det andre merkede materiale konkurrerer med analytten som måles med henblikk på å innta bindingssetene på reseptormolekylet. I et annet alternativ involverer tilbaketitreringsteknikken kontakt mellom reseptormolekylet inneholdende bundet analytt med et materiale i stand til å binde med den bundne analytt, eller med kun bindingssetene som er opptatt av bundet analytt, idet dette materiale i seg selv er merket eller derefter merkes ved festing av en merket markør. Dette system er kjent som et ikke kompetitivt system fordi det ikke er noen konkurranse for bindingssetene.

I både det kompetitive og det ikke-kompetitive system er tilbaketitreringsreagensen (analytt eller annet materiale) merket med en markør. Et antall markører har vært benyttet, for eksempel radioaktive isotoper (radioimmunoanalyse), enzymer, kjemiluminescente stoffer og fluorescente markører (fluorimmunoanalyse), idet de sistnevnte enten hører til klassen konvensjonelle fluorescente stoffer som fluorescein eller et stoff som blir fluorescent kun ved aktivering og bedømmelse ved tidoppløst pulsfluorescens som et europium- eller et annet lanthanidechelate, hvorved størrelsesordenen av fluorescensen som belyst ved scandering med en høyintensitets lysstråle med egnet bølgelengde er et mål for den mengde av det merkede materiale som tas opp av reseptormolekylet som inneholder bundet analytt.

Hittil kjente analyseteknikker har til nu vært avhengig enten av en nøyaktig kjennskap til den totale mengde av reseptoren som er til stede i hver prøve eller kjennskapet til den mengde reseptor som forblir nøyaktig den samme fra prøve til prøve, spesielt fra den ukjente prøve til standardprøvene som benyttes for kalibreringsformål. De har også krevet en nøyaktig kjennskap til det totale prøvevolum. Visse krav stammer fra det faktum at det målte signal, for eksempel fluorescensen, i slike systemer er representative for den totale mengde merket materiale som er bundet og, forutsatt at ikke alt merket materiale er bundet (hvilket tilfelle systemet ville være ikke-responderende til endringen i mengden analytt som er til stede) er denne totale mengde avhengig ikke bare av den fraksjonelle okkupasjon av bindingssetene på reseptormolekylet men også på mengden reseptormolekyl som er til stede. Kort sagt har fluorescenssignaler som avgis i til nu kjente fluorimmunoanalyseteknikker uavhengig vært avhengig av på en kompleks (og i praksis ukjent) måte på mengden reseptormolekyl som benyttes i systemet og på den totale mengde analytt som er til stede; dette implikerer at både mengden reseptor og prøvevolumet som benyttes omhyggelig må standardiseres for å sikre korrekt

bedømmelse av analyttkonsentrasjonen i prøven, idet slike standardiseringer er et karakteristisk og vesentlig trekk ved alle til nu kjente fluorimmunoanalyseteknikker, spesielt de som beskrives som kompetitive som definert overfor. Det skal videre påpekes at, i slike teknikker, den fraksjonelle okkupasjon av antistoffet av analytten (og derved det fluorescente signal som avgis) i seg selv er avhengig av mengden tilstedeværende reseptor; en økning av antall reseptormolekyler med en gitt faktor øker altså for eksempel antallet analyttmolekyler som det binder, men med en helt annen faktor, noe som gir en markert endring i reseptorens fraksjonelle okkupasjon. Mengden merket materiale som binder til reseptoren vil også øke men også her på ikke-proporsjonal måte.

Nødvendigheten for standardisering av mengden reseptor som benyttes (et trekk ved hittil kjente fluorimmunoanalyseteknikker som deles av analoganalysemetoder ved bruk av andre markører slik som radioisotoper) er ikke bare eksperimentelt påvisbar men er teoretisk forutsigbare ut fra massevirkningslovens betraktninger som styrer reseptor/ligand interaksjonene. Videre har det dette krav også i lang tid vært erkjent som en alvorlig mangel ved disse teknikker og som har forårsaket store problemer ved kvalitetskontrollen av immunoanalyse-systemer, spesielt de der reseptoren (antistoffet) er bundet til en fast bærer, og der det kan være teknisk vanskelig å sikre at nøyaktig den samme mengde reseptor kobles til det faste materiale som innføres i hver prøveinkuberingsblanding. I denne kontekst skal det bemerkes at det ikke er ukjent for fagmannen å overvåke eller å undersøke mengden reseptor som kobles til faste bærere ved merking av selve reseptoren (for eksempel med en radioisotop) for å sikre konstant verdi av mengden som kobles på denne måte. Videre er det også erkjent av fagmannen at små variasjoner i mengden reseptor som kobles partielt kan korrigeres ved bruk av en reseptormerkingsteknikk hvis avvik fra standardreseptormengden er kjent. Ikke desto mindre,

fordi analyttens fraksjonelle okkupasjon av antistoff-bindingssetene på kompleks og i praksis ukjent måte avhenger både av mengden reseptor og tilstedeværende analytt, er slike omtrentlige korreksjoner av begrenset brukbarhet og benyttes sjeldent, hvis overhode, som rutine.

Det er for eksempel i WO 80/02076 foreslått å forbedre kvalitetskontrollen av immunoanalyser ved å tilveiebringe to separate merkelapper, fortrinnsvis fluorescenter slike, i systemet, idet den ene festes til den konkurrerende ligand som definert ovenfor og en andre festes til reseptormolekylet. Det angis der at direkte merking av reseptormolekylet har den fordel at reseptormolekylet kvantitativt kan detekteres under en immunoanalyseprosedyre uavhengig av kvantitativ detektering av merket (konkurrerende) ligand slik at immunoanalyseprosedyren kan gjøres selvkalibrerende. I henhold til en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen blir en fluorescent merkelapp på reseptormolekylet og en fluorescent merkelapp på den merkede eller konkurrerende ligand detektert kvantitativt mens de er bundet til hverandre og kvantiteten av analytten som er til stede i en ukjent prøve bestemmes som en funksjon av forholdet mellom de kvantitative målinger av de to merkelapper.

Det er klart fra beskrivelsen i WO 80/02076 at, i stedet for bruken av en andre merkelapp, de beskrevne immunoanalyser gjennomføres på konvensjonell måte. I såkalte "kompetitive aminoanalyser" er det vanlig å benytte tilstrekkelig reseptor til å binde 30 -50% av begge de merkede ligand- og ikke-merkede analyttmolekyler som er til stede (idet ikke-merket analyttkonsentrasjonen nærmer seg null). I de såkalte "ikke kompetitive" analyser blir sogar høyere konsentrasjoner av reseptor vanligvis benyttet idet man regner med en binding nær 100% av tilstedeværende analytt. Det er ganske klart under disse omstendigheter at forholdet mellom signalene som avgis av den merkede reseptor og den merkede tilbaketitreringsmarkør ikke forblir konstant hvis mengden reseptor

varierer. (I et ikke kompetitivt analyseoppsett vil for eksempel en dobling av mengden av merket reseptor ikke signifikant øke mengden bundet analytt; således vil forholdet grovt halveres. Tilsvarende betraktninger gjelder de kompetitive systemer som er diskutert i WO/80/02076.)

Beskrivelsen i WO 80/02076 tilveiebringer således kun et grovt middel for en omtrentlig korreksjon for mindre variasjoner i mengden reseptor som er til stede i analyse-systemer av denne type som beskrevet ovenfor, og er i anvendelse begrenset til dette formål. Kort sagt kan forholdet mellom de kvantitative målinger av de to merkelapper (merkene reseptor og konkurrerende ligand) vises, både teoretisk og eksperimentelt, ikke generelt å utgjøre noe mål for mengden analytt i et konvensjonelt reseptorbasert analysesystem (som en immunoanalyse) og bruken av dette forhold som en responsvariabel vil derfor generelt gi grunn til analyttmålinger som er belemret med feil. Således tilbyr beskrivelsen i WO 80/02076 en teknikk (med begrenset brukbarhet) for samtidig overvåking (og en tilnærmet korreksjon for) små variasjoner i mengden av reseptor som er til stede i individuelle prøveinkuberingsrør som beskrevet ovenfor, de beskriver imidlertid ikke konstruksjon og drift av analysesystemer der det målte forhold mellom to merkelapper er et nøyaktig og pålitelig mål for analyttkonsentrasjonen i prøven.

Videre skal det fremheves at selv når, og dette er vanligvis tilfelle, mengden reseptor meget nøyaktig kan være standardisert (for eksempel kan mengden reseptor i hvert inkuberingsrør holdes konstant meget nær visse spesielle grenser, og der korreksjoner for mengden reseptor som er til stede som beskrevet i WO 80/02076 hverken er nødvendig eller brukbar), vil det resulterende immunoanalysesystem vanligvis kreve "kalibrering" (det vil si at inklusjonen av sett av analysestandarter inneholder kjente mengder analytt) og dette er konvensjonelt i denne teknikk. Så langt kravet som fore-

5 ligger i WO 80/02076 at merking av reseptoren gir en immunoanalyse "selvkalibrerende" egenskaper, gyldighet, er dette kun i det snevre område at kortvarige variasjoner i effektiviteten av signaldetekteringsutstyret (for eksempel radioisotoptelleren, fluorometere og så videre, avhengig av benyttet merkelapp, på samme måte automatisk kan korrigeres) fordi en reduksjon av detekteringseffektiviteten for en merkelapp ville forventes å ledsages av en grovt sett proporsjonal reduksjon av detekteringseffektiviteten for den andre, noe som gjør at forholdet forblir i det vesentlige konstant).

Således gir som en oppsummering beskrivelsen i WO 80/02076 maksimalt midler for en omtrentlig korrigerings av

- 15 a) små variasjoner i mengden reseptor som benyttes i reseptorbaserte analyser, og
- b) små, korttidsvariasjoner i signaldetekteringseffektiviteten av merkelappmålingsutstyret. Disse korreksjoner er av begrenset verdi og brukbarhet og har av disse grunner ikke vært innarbeidet i rutineanalysepraksis.

25 Foreliggende oppfinnelse angår reseptoranalyse av et totalt forskjellig konsept og en helt annen konstruksjon enn det er tatt sikte på eller beskrevet i WO 80/02076 og der den fraksjonelle okkupasjon av reseptoren er et virkelig og nøyaktig og pålitelig mål for analyttkonsentrasjonen i mediet (uansett de totale mengder reseptor eller analytt som er til stede). Disse systemer som ikke er antydte eller tatt sikte på i WO 80/02076 avhenger nødvendigvis og spesifikt av målinger av den fraksjonelle analyttokkupering av reseptoren, det vil si av målinger av forholdet mellom ikke-okkuperte (eller okkuperte): total reseptorseter (eller et i det vesentlige ekvivalent forhold, for eksempel ikke-okkupert:okkupert seteforhold), og krever derfor henholdsvis separat merking av disse to klasser seter. Det er inter alia funnet at disse systemer krever at de relative mengder

reseptor og analytt, og affiniteten mellom disse, er slik at innføringen av reseptoren i prøvemassen ikke har noen vesentlig betydning på konsentrasjonen deri av analytten.

5 I henhold til oppfinnelsen tilveiebringes det derfor en immunoanalyse for bestemmelse av konsentrasjonen av en analytt i en ukjent væskeprøve omfattende å bringe prøven i kontakt med en reseptor med bindings seter på molekylene for analytten og merket med en første markør, hvorved en fraksjon
10 av bindings setene på reseptormolekylet okkuperes av analytten, tilbaketitrering av reseptoren med fraksjonelt okkuperte bindings seter ved hjelp av en tilbaketitrerings-
teknikk som involverer et system inkludert en andre markør forskjellig fra den første, måling av de relative styrker av
15 de to signaler som dannes av de to markører for å tilveiebringe en verdi som er representativ for den fraksjonelle okkupasjon av bindings setene på reseptormolekylet av analytten, og sammenligning av denne verdi med en eller flere tilsvarende verdier oppnådd på samme måte ved bruk av en
20 eller flere standard væskeprøver av kjent analyttkonsentrasjon, og denne analyse karakteriseres ved at de ukjente og standardvæskeprøvene alle bringes i kontakt med en liten mengde av reseptoren, avhengig av affinitetskonstanten med analytten, at ikke mer enn 5% av analytten blir bundet til
25 reseptoren.

Ikke mer enn 5% av analytten betyr en fraksjon som er tilstrekkelig liten til at feil som innføres ved å tillate en endring i initialanalyttkonsentrasjonen er så liten som,
30 eller mindre enn, de feil som uunngåelig innføres i målingsprosedyren andre steder ved begrensninger av nøyaktigheten av prøve- og reagensmanipulering, signalmåling, standardisering, temperaturvariasjon og lignende. Generelt sett utgjør slike feil vanligvis totalt opptil 10% eller mindre og
35 bindingen av 5% eller mindre av den totale analytt i testprøvene ville derfor på samme måte forårsake interprøve-målingsfeil som stammer fra denne spesielle kilde og bidra

til neglisjerbarhet i forhold til det totale. Ikke desto mindre kan denne grense enkelte ganger overskrides uten skade. Ideelt er det imidlertid foretrukket å minimalisere målingsfeil ved å redusere mengden analytt som er bundet til reseptoren til 1 - 2% eller mindre av det totale.

Forutsatt at kun en ubetydelig andel av analyttene blir bundet er det funnet at den fraksjonelle okkupasjon, F, av bindingssetene på reseptormolekylet henger sammen med konsentrasjonen av analytt i prøven via følgende ligning (ved termodynamisk likevekt):

$$F = \frac{K[A]}{1 + K[A]}$$

der [A] er konsentrasjonen av analytt i prøven og K er affinitetskonstant for reseptoren for analytten og er en konstant ved en gitt temperatur.

Ved analysen ifølge oppfinnelsen kan en hvilken som helst av de kjente typer markører benyttes, for eksempel radioaktive isotoper (for eksempel radioaktivt iod), kjemiluminescente stoffer, fluorescente markører og enzymer. Disse kan festes til reseptormolekylet og tilbaketitreringsreagensen på vanlig måte. Begge markører vil vanligvis være av samme type selv om de er forskjellige. Markørene vil kvantitativt detekteres på en måte egnet deres natur, for eksempel ved telling av radioaktiviteten av en radioaktiv markør eller scandering av en fluorescent markør med en lysstråle, hvis nødvendig etter aktivering. Fortrinnsvis benyttes fluorescente eller potensielt fluorescente markører. Det er således mulig å eksitere de to fluorescente markørmerkelapper samtidig ved scandering med en enkelt lysstråle med egnet bølgelengde og å måle de relative styrker av de to fluorescente signaler. Dette forhold er direkte representativt den fraksjonelle okkupasjon av bindingssetene av reseptoren og, under de gitte betingelser, uavhengig av den nøyaktige mengde reseptor som

er til stede og andelen av totalmengde som benyttes for bestemmelse ved scandering med lysstrålen. Således er det ikke lenger noe behov for å benytte ikke-varierende eller nøyaktig kjente mengder reseptor, heller ikke for overflatedensitet av reseptoren, heller ikke for at overflatedensiteten av reseptoren på substratet skal være enhetlig.

I et annet aspekt involverer oppfinnelsen dannelsen av merkede produkter som mellomprodukter i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen idet de merkede produkter omfatter reseptormolekyler merket med en første, fortrinnsvis fluorescerende markør, og med bindings seter av hvilke en andel er opptatt av molekyler av en analytt idet andelen helt ut er representativ for konsentrasjonen av analytten i en prøve med hvilken reseptormolekylene er bragt i kontakt på grunn av bruken av kun en spormengde av reseptoren i forhold til analytten, og et materiale bundet enten direkte eller indirekte til de opptatte bindings seter eller til ikke-opptatte bindings seter, og merket med en andre, fortrinnsvis fluorescerende markør, forskjellig fra den første.

I ytterligere et aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et sett for bruk i en metode for å bestemme konsentrasjonen av en analytt i en væskeprøve idet dette sett karakteriseres ved at det omfatter et fast substrat hvor til det er festet molekyler av en reseptor merket med en første, fortrinnsvis fluorescerende markør og med bindings seter for en analytt, i det mengden reseptor på substratet er valgt i henhold til størrelsen av den flytende prøve slik at kun mindre enn 5% av analytten i prøven bindes til reseptoren, en eller flere standardopløsninger inneholdende kjente konsentrasjoner av analytten og et tilbaketitreringsreagens merket med en andre, fortrinnsvis fluorescerende markør, forskjellig fra den første, og i stand til å binde direkte eller indirekte enten med den bundne analytt eller med bindings setene opptatt av den bundne analytt eller for å

binde med bindingssetene som ikke er opptatt av den bundne analytt.

Oppfinnelsen skal illustreres ved de ledsagende tegninger som:

Figur 1 skjematisk viser et kompetitivt og ikke-kompetitivt system ifølge oppfinnelsen; og

Figur 2 viser et perspektivriiss av et analytisk sett ifølge oppfinnelsen.

Under henvisning til figur 1 viser diagrammet en merket reseptor 1, eksemplifisert av et første antianalytt-antistoff merket med en første ikke vist fluorofor. Reseptoren 1 har på molekylet bindingsseter 2 av hvilke enkelte er opptatt av analyttmolekyler 3. I det ikke-kompetitive system A er de bundne analyttmolekyler 3 i sin tur bundet til et merket materiale, eksemplifisert av et andre antianalytt-antistoff 4 som er merket med en andre ikke vist fluorofor. I det kompetitive system B er bindingssetene 2 på det første antianalytt-antistoff 1 som ikke er opptatt av analytten 3, opptatt av en merket reagens, eksemplifisert ved et anti-ideotypisk antistoff 5, også merket med den andre ikke viste fluorofor. Det komplette system scanderes av en laserstråle 6 og den første fluorofor avgir α -fotoner 7 og den andre fluorofor avgir β -fotoner 8 som differensieres fra α -fotonene ved hjelp av en egenskap eller virkning. Både α - og β -fotonsignalene påvirkes likt ved endringer i den totale mengde eller overflatedensitet av det første antianalytt-antistoff som er til stede forutsatt at det fraksjonelle belegg på bindingssetene er uendret, men kun α -fotonsignalet påvirkes av endringer i det fraksjonelle belegg av bindingssetene på grunn av analytten idet dette økes med økende belegg i det ikke-kompetitive system men reduseres med økende belegg i det kompetitive system. Således er forholdet mellom de to signaler avhengig av det fraksjonelle belegg men ikke av den totale mengde av det første antianalytt-antistoff.

Foreliggende oppfinnelse kan benyttes for å anslå en hvilken som helst analytt for hvilken en reseptor med egnede bindingssteder i molekylet er kjent eller kan fremstilles. Den kan spesielt benyttes for å anslå nøyaktig konsentrasjoner i picomolart eller nanomolart område så vel som høyere konsentrasjoner i det mikromolare området, for eksempel 10^{-9} til 10^{-5} molare område. Analytter som kan anslås på denne måte inkluderer hormoner som thyroïdhormoner eller steroidhormoner, for eksempel cortison, vitaminer, proteiner og proteinhormoner som insulin samt gonadotrofiner, virusser, medikamenter, gifter og andre normale eller abnormale komponenter i human- eller animal kroppsvæsker som blod, serum, spytt, urin eller lignende. Eksempler på slike analytter er angitt i WO 80/02076 som nevnt ovenfor og konsentrasjonen kan måles ved hjelp av oppfinnelsens analyse. Spormengder som toksiner, fremmedproteiner og lignende i næringsmidler og biologiske kontaminanter i vann og andre flytende media kan også påvises. Analytten som skal påvises kan være til stede i en prøve i likevekt med den samme analytt reversibelt bundet til et bindingsmiddel, som et endogent bindende protein, der konsentrasjonen av fri analytt måles ved oppfinnelsens analyse. Alternativt kan prøven være fri for reversibelt bundet analytt og oppfinnelsen kan ha større viktighet for slike målinger da den reversibelt bundne analytt ikke er tilgjengelig for å dissosiere og således å bufre endringer i analyttkonsentrasjonen på grunn av opptaket av reseptormolekylet.

Reseptoren som benyttes vil være en med bindingssteder på molekylet for analytten som skal bestemmes. Disse bindingssteder bør være i det vesentlige konstante i antall pr. molekyl og bør således være kjemisk bindingssteder eller fysikalske absorpsjonssteder. De bør også være i stand til belegg kun av analytten sammenlignet med enhver annen bestanddel av prøvene som analyseres og vil således fortrinnsvis være spesifikke for analytten. Antistoffer, for eksempel monoklonale antistoffer, er spesielt foretrukne

reseptormolekyler, men enzymer spesifikke for ytterligere analytter er andre eksempler på reseptormolekyler som kan benyttes. Antistoffer for et vidt område for analytter er kjente eller beskrevet i litteraturen og er kommersielt tilgjengelige, og andre antistoffer spesifikke for andre hormoner og så videre kan fremstilles ved kjente teknikker som ikke utgjør en del av oppfinnelsen. For å maksimalisere nøyaktigheten av målingen blir reseptoren fortrinnsvis valgt med en affinitetskonstant for analytten slik at mellom 25 og 75% av bindingssetene på reseptormolekylet er opptatt av analytten i den forventede konsentrasjon i den ukjente prøve, det vil si at den har en affinitetskonstant fra 1/3 til 3 ganger den resiproke verdi av den forventede analyttkonsentrasjon. Affinitetskonstantene for reseptorene kan bestemmes ved en standard Scatchard-analyse ("Ann. N.Y. Sci.", 51, (1949, 660).

Det som skal merkes for immunofluorometrisk analyse eller fluoroimmunoanalyse, uansett om dette er antistoffer (både antianalytt- eller antiideotypiske slike), enzymer, analytter eller lignende, kan merkes enten med konvensjonelle fluorescerende stoffer som fluorscein eller med stoffer som kan benyttes i tidsopløst pulset fluorescens som europium eller andre lantanide chelater, se for eksempel S. Dakubu og andre, "High sensitivity pulsed-light time-resolved fluoroimmunoassay" i "Practical Immunoassay" utgitt av W. Butt, Marcel Dekker Inc. (1984) på sidene 71-101, og begge typer stoffer ligger innenfor uttrykket "fluorescent markør". Metoder for merking av elementer med fluorescente markører for å gi en egnet (tilstrekkelig høy) spesifikk aktivitet (forholdet mellom merkede molekyler og det totale antall molekyler eller det totale antall bindingssteder) er kjent i teknikken og beskrevet i litteraturen, for eksempel i "Alternative Immunoassays", utgitt av W.P. Collins, fra John Wiley & Sons Ltd., 1985, spesielt kapittel 13, og i referansene som der angis slik som Soini E. og Hemmila I., "Fluoroimmunoassay: present status and key problems" Clin. Chem., 25, 353-361

(1979). EP-søknad 2 963 og 64 484, GB-PS 1 560 402 og Internasjonal søknad WO 86/01064 og de referanser som nevnes i teksten eller granskningsrapporten, også det WO 80/02076 som nevnt ovenfor, er ytterligere eksempler for litteratur på dette område. Slike teknikker kan benyttes for merking av reseptormolekylene for bruk i foreliggende søknad. Det er også mulig å bevirke merking ved innarbeiding av en fluorescent enhet i en egnet mengde ved hjelp av en rekombinant DNA-teknikk. Som nevnt ovenfor ligger merking med radioisotopiske eller andre markører også innenfor oppfinnelsens ramme.

Reagenser egnet for bruket i tilbaketitreringsteknikken enten ved bruk av et kompetitivsystem, for eksempel med et anti-ideotypisk antistoff eller en merket analytt, eller et ikke-kompetitivt system, for eksempel med et antianalytt-antistoff, er også enten kjent i teknikken eller kan fremstilles ved konvensjonelle teknikker. Reagensene kan i seg selv merkes med en markør, fortrinnsvis en fluorescent markør, igjen av kjent eller konvensjonell type ved bruk av en kjent eller konvensjonell teknikk, før bruk, eller de kan omsettes in situ med en ytterligere reagens som i seg selv er merket med en slik markør. De behøver ikke skille seg fra tilbaketitreringsreagensene som benyttes i konvensjonelle immunoanalyseteknikker som benytter ikke-merkede reseptormolekyler bortsett fra så langt dette er nødvendig, for eksempel for å sikre at når to fluorescerende markører benyttes, avgir de signaler som kan differensieres ved samtidig scandering med en lysstråle hvis en slik teknikk benyttes. Tilbaketitreringen kan gjennomføres etter separeringen av den ikke-bundne analytt fra kontakten med reseptormolekylene (en to-trinnsanalyse), eller, forutsatt at prøvevolumet er kjent, samtidig med kontakten med den ikke-bundne analytt med reseptormolekylene (en en-trinnsanalyse).

Signalene som avgis av de to markører kan være signaler i stand til å kunne differensieres på forskjellige alternative

måter, for eksempel ved hjelp av bølgelengden til de avgitte fotoner, på grunn av tidsforløpet av fluorescensen når det gjelder tidsoppløst pulset fluorescens (begge eller kun en av markørene som viser en slik tidsnedbrytning), eller ved polarisering. Bølgelengdene, tid-nedbrytningsmønstrene og så videre for et antall markørsystemer er allerede kjent i litteraturen og andre kan bestemmes ved kjente teknikker. De to markører bør gi signaler som er tilstrekkelig forskjellige til å muliggjøre at de kan oppløses ved hjelp av måleinstrumentet. De karakteristiske trekk for de fluorescerende signaler som avgis av et antall fluorescente markører under de spesielle betingelser er allerede kjent eller beskrevet i litteraturen og de til andre markører kan bestemmes på konvensjonell måte. Således ligger valget av et egnet par markører innenfor kompetanseområdet til fagmannen.

Selv om det i prinsippet er mulig at måling av forholdet mellom signalene kan skje i oppløsning ville dette nødvendigvis gjøre totalfjerning av all merket tilbaketitreringsreagens som ikke er bundet til det merkede reseptormolekyl/bundet analytt-system, for eksempel ved bruk av et immunoabsorpsjonsmiddel, før målingen kan gjennomføres, og et slikt fjerningstrinn er u hensiktsmessig. Det foretrekkes derfor at de merkede reseptormolekyler bindes som et monosjikt til et fast substrat og separeres fra gjenværende ikke-bundet analytt og gjenværende ikke-bundet merket tilbaketitreringsreaksjon som er til stede i væsken eller i væskene hvori analysen gjennomføres, før måling av signalforholdet gjennomføres. Egnede substrater er laget av glass, plast eller lignende og teknikker for binding av reseptormolekylet slik som antistoffer til slike overflater er velkjente og kan benyttes for oppfinnelsens formål, se for eksempel US-PS 4 399 217, 4 381 291, 4 357 311, 4 343 312 og 4 260 679.

I en ytterligere utførelsesform er det mulig å binde et antall forskjelligmerkede reseptormolekyler på i avstand anbragte lokaliseringer på et enkelt langstrakt fast substrat

som en plate eller stav, for eksempel av et inert plastmateriale som polystyren, idet hver av de forskjellige lokaliseringer er utstyrt med reseptormolekyler med bindings seter for en spesiell analytt slik at de forskjellige lokaliseringer binder forskjellige analytter. En slik flerlokaliseringssinnretning kan så benyttes for å anslå konsentrasjonene av et antall analytter i en enkeltflytende prøve, idet separat merkede tilbaketitreringsreagenser tilveiebringes for hver forskjellig analytt slik at hvert par av merkelapper er i stand til å kunne differensieres og forholdet mellom styrkene av signalene bestemmes. Dette er av spesiell fordel der en væske slik som en kroppsvæske inneholder eller kan inneholde flere forskjellige bestanddeler av interesse og konsentrasjonen for hver av disse må kjennes. (Selv om bruken av merkede reseptormolekyler letter fremstilling av slike flerlokaliseringssinnretninger på grunn av at mengden reseptormolekyl ikke behøver å være konstant fra en til en annen lokalisering på en eller en annen innretning, vil det også være mulig å fremstille en slik plate ved bruk av ikke-merkede reseptormolekyler forutsatt at mengden reseptormolekyl i hver flekk nøyaktig er kjent på annen måte og/eller nøyaktig kan kontrolleres for å være konstant fra innretning til innretning.) Et slikt analytisk verktøy er illustrert i figur 2 i de ledsagende tegninger. Under henvisning til denne figur består en plate 20 av rektangulær eller en annen hensiktsmessig form av polystyren eller et annet inert materiale. Den er tildannet med et antall preginger eller brønner 21, hver med en størrelse til å kunne oppta en mikrokule 22, på samme måte fremstilt av polystyren eller et annet inert materiale, hensiktsmessig med en diameter på ca. 1 mm eller mindre. Disse kuler er tidligere dynket på hensiktsmessig måte i oppløsninger inneholdende en reseptor, for eksempel et antistoff, for å avsette reseptoren som et sjikt på overflaten av kulen idet forskjellige kuler er dynket i forskjellige oppløsninger inneholdende forskjellige reseptorer, og de forskjellige reseptorer velges i henhold til analyttene som skal bedømmes og eventuelt merkes med en

egnet markør. Mikrokulene 22 holdes tilbake i brønnene 21 ved hjelp av et egnet inert adhesiv slik som et konvensjonelt kommersielt tilgjengelig adhesiv for polystyren.

5 I en slik innretning med merkede mikrokuler blir mikrokulene 22 på platen 20 bragt i kontakt med prøven inneholdende analytt eller analytter som skal bedømmes og så med egnede tilbaketitreringsreagenser med egnede merkelapper fulgt av anslag av de relative signalstyrker for de to markører.
10 Forskjellige markører velges for forskjellige kuler og tilbaketitreringsreagenser for å muliggjøre avlesning for en kule å være separert fra den til en annen, eller alternativt hver kule separat scanderes idet det sistnevnte alternativ lettes ved bruk av fluorescente eller fluorogene markører.

15 En slik innretning kan konstrueres på tallrike andre måter. For eksempel kan kulene 22 være utelatt og reseptorene påført direkte i brønnene 21 som oppløsninger og eventuelt oppløsningsmidlene være fjernet for å etterlate faste sjikt.
20 Videre kan kuler og brønner være utelatt og reseptorene trykket på plateoverflaten på egnet måte. Platen kan også være erstattet av en stav eller en annen base. Antallet forskjellige reseptorer kan være så lavt som to eller betydelig høyere, for eksempel 5, 10 eller flere, og antallet
25 forskjellige flekker med den samme reseptor kan være en eller flere idet bruken av forskjellige flekker med den samme reseptor gir midler for å undersøke resultatene fra en enkelt flekk.

30 Instrumenter i stand til å måle pulsede fluorescente signaler fra stoffer på et fast substrat som en plate er kjent kommersielt, på samme måte som instrumenter for måling av signaler i oppløsning. Hvis instrumenter for direkte måling av forholdet i et enkelt trinn ikke er tilgjengelig er det,
35 selv om det er mindre foretrukket, selv om det er mulig å måle de to signaler separat og å konstruere et forhold ut fra disse målinger ved hjelp av egnede forholdsregler. WO

80/02076, supra, beskriver andre måleinstrumenter som kan benyttes ifølge oppfinnelsen. Den scanderende lysstråle er fortrinnsvis en høyintensitets monokromatisk eller i det vesentlige monokromatisk stråle, spesielt laserstråle. Bølgelengdene for eksitering av fluorescensen ved bruk av den scanderende lysstråle bør velges i henhold til arten av de fluorescerende markører i henhold til kjente prinsipper og det er klart å foretrekke at begge signaler er i stand til eksitering av og i virkeligheten å kunne eksiteres av en stråle med en enkelt bølgelengde. Pulset fluorescens med tidsoppløsning er den foretrukne teknikk for i det minste en av markørene fordi dette muliggjør at bakgrunnsinterferensen kan elimineres lettere, men er ikke noen vesentlig del av oppfinnelsen. Hvis andre typer markører benyttes blir egnede standardtelle- eller bedømmelsesinnretninger og metoder benyttet i stedet.

Fordi oppfinnelsen arbeider ved bruk av antistoffer eller andre reseptormolekyler i en så liten mengde og med en slik affinitetskonstant for analytten som skal analyseres at kun mindre enn 5 og fortrinnsvis mindre enn 1% av den totale mengde tilstedeværende analytt i prøven blir bundet til reseptormolekylene, er det nødvendig å benytte en prøve med kjent volum for konsentrasjonsmålingene eller prøver med konstant volum for kalibreringsprøvene, heller ikke må et slikt volum måles nøyaktig eller i det hele tatt, forutsatt at det er tilstrekkelig stort i forhold til mengden reseptor at kun en ubetydelig andel av analytten bindes til reseptoren. Innretningen kan derfor benyttes som en probe for å overvåke blandet analyttkonsentrasjoner i store fluidmasser slik man finner disse i industrielle prosesser.

En ytterligere fordel er at, når man benytter fluorescent markører og scandering med en lysstråle, lysstrålen ikke behøver å omfatte hele flekken som inneholder reseptormolekylene, men kan kun av søke en del av flekken på grunn av

at den totale mengde av bundet analytt og reseptormolekyl ikke behøver å studeres.

5 Det er også unødvendig at, når man benytter et kompetitivt system for tilbaketitrering, det merkede antiideotypiske antistoff eller andre merkede tilbaketitreringsreagenser okkuperer alle bindingssetene som er tilbake ikke-okkupert av analytten, forutsatt at de okkuperer en andel av dem som forblir konstant mellom anslagene ved bruk av den flytende 10 prøve av ukjent analyttkonsentrasjon og standardene for kjent analyttkonsentrasjon. Dette vil generelt involvere bruken av konstant (relativt høye) konsentrasjoner av antiideotypisk antistoff eller andre merkede tilbaketitreringsreagenser eksponert til spormengder av reseptormolekyl/bundet analytt- 15 system eller bruken av konstante volumer så vel som konstante konsentrasjoner. Tilsvarende bemerkninger gjelder omsetningen av bundet analytt- analyttokkuperte bindingsseter i det ikke-kompetitive tilbaketitreringssystem.

20 Foreliggende oppfinnelse kan pakkes for kommersiell bruk for bedømmelse av analytter i hospitaler og lignende, i forbindelse med et egnet fluorescensmående instrument, i form av et sett bestående av de merkede reseptormolekyler på et fast substrat, standardoppløsninger av analytt og merkede 25 tilbaketitreringsreagenser. Bruken av et slikt sett vil muliggjøre at målinger kan gjennomføres rutinemessig på egnede instrumenter.

30 Oppfinnelsen skal ytterligere illustreres ved de følgende eksempler.

Eksempel 1

35 Illustrering av hovedprinsippene for metodologien i en analyse av thyroxin T₄ ved bruk av radiomerket (¹³¹I) antithyroxin antistoff og radiomerket (¹²⁵I) thyroxin, og av seleksjonen av reagenskonsentrasjonene for å oppnå en gyldig merkelappforhold immunoanalysemetode.

(Antithyroxin antistoff er kommersielt lett tilgjengelig og er fremstilt i "Department of Molecular Endocrinology" ved Middlesex Hospital Medical School, Mortimer Street, London, både ved konvensjonelle (in vivo) immuniseringsteknikker og ved in vitro monoklonale antistoff-fremstillingsmetoder.) Antithyroxin antistoffer som benyttes i dette eksempel var et spesifikt T4 monoklonalt antistoff fremstilt ved seleksjon fra et spektrum av antistoffer fremstilt ved immunisering av mus ved bruk av storfetyroglubulin som immunogen. Den har en bindingskonstant i størrelsesorden 10^9 og er ellers ikke-eksepsjonell når det gjelder bindekarakteristika. Merkingen skjedde med ^{131}I ved bruk av den konvensjonelle kloramin-T teknikk som vanligvis brukes for preparering av iodmerkede antistoffer og andre proteiner. Den ble derefter koblet til en kommersielt tilgjengelig mikrokrySTALLINSK cellulose (Sigma-Cell Type 20) ved bruk av en konvensjonell teknikk ("Clinica Chimica Acta.", vol. 118, (1982) s. 129-134).

Høyspesifikt aktivt ^{125}I merket thyroxin er kommersielt tilgjengelig.

T4 som er til stede i serumet, 1 ml, ble ekstrahert ved bruk av en kommersielt tilgjengelig anionbytteharpiks (BioRad AG1x2 (400-600 mesh) som kolonne) og eluert med 70% eddiksyre etter vasking (se Endocrinology, 117 (1985)). Gjenvinningsforsøk (ved bruk av neglisjerbare spormengder ^{125}I merket T4 som til å begynne med var tilsatt til prøveserumet) viste totalgjenvinning i størrelsesorden 70%). Prøveserum-eluatene ble hver oppløst i en standard Hepes-buffer på 50 ml hvorved man opplevde T4-oppløsninger som ble beregnet innen konsentrasjonsområdet 0,5 til 1,5 ng/ml (det vil si i størrelsesorden 10^{-9} mol/l). Standard T4-oppløsninger ble fremstilt ved egnet fortykning av en lageroppløsning av T4 i Hepes-buffer for derved å oppnå et spektrum av T4-konsentrasjoner på mellom 0 og 10 ng/ml.

I en første serie forsøk ble forskjellige mengder fastfase ^{131}I -merket antistoff inkubert sammen med 1 ml volumer av standardoppløsninger inneholdende T4 sammen med spormengder ^{125}I -merket T4, idet den kombinerte T4-konsentrasjon var lik 0,1 ng/ml for inkuberingstider varierende fra 10 minutter til 8 timer. Etter inkubering ble det fastfasede antistoff separert ved sentrifugering, vasket og den adsorberte ^{125}I -merkede T4 tellet ved bruk av en dual kanal γ -teller, og konvensjonelle beregningsmetoder for å skille ^{125}I aktiviteten per se. Kurver som relaterer antistoff adsorbent ^{125}I aktivitet med inkuberingstiden og mengder merket antistoff ble trukket opp. På basis av disse data ble en mengde antistoff og en inkubasjonstid valgt slik at i størrelsesorden 5% av det totale T4 som er til stede i inkuberingsblandingen (for eksempel ca. 5 pg, noe som gir ca. 1000 ^{125}I tellinger/min.) ble beregnet som adsorbent av antistoffet (det vil si en mengde antistoff som gir ca. 200 ^{131}I tellinger/min. og en total inkuberingstid på 4 timer. Det ble bekreftet at under disse betingelser: a. endret en økning eller reduksjon av mengden antistoff som ble benyttet med en faktor 2, ikke vesentlig (det vil si innen 2%) forholdet $^{125}\text{I}:^{131}\text{I}$; b. en økning av volumet av standardoppløsningen påvirket ikke $^{125}\text{I}:^{131}\text{I}$ -forholdet.

Ved bruk av denne standardmengde antistoff ble analysekalibrering gjennomført på følgende måte. Standardmengden antistoff ble inkubert med 1 ml volumer av standard T4-konsentrasjoner som beskrevet ovenfor og i 4 timer. Fastfase-antistoffet ble så i hvert tilfelle isolert ved sentrifugering, kort vasket med buffer og reinkubert med 3 ml volumer av en standard oppløsning av ^{125}I -merket T4 inneholdende ca. 1 ng/ml T4 i ytterligere 4 timer. Fastfase-antistoffet ble igjen, i hvert tilfelle, isolert ved sentrifugering, omhyggelig vasket 4 ganger for å fjerne all gjenværende ^{125}I -merket T4-oppløsning og $^{125}\text{I}:^{131}\text{I}$ -forholdet tilsvarende hver standard T4-konsentrasjon, målt. Fordi en standardtelling av antistoff (som ga ca. 200 ^{131}I tellinger/min.) var benyttet i

denne serie, var ^{131}I -tellingen i det vesentlige konstant i hvert tilfelle; ^{125}I -tellingen kunne ikke desto mindre varieres fra ca. 2000 tellinger/min. når det gjaldt null T4-konsentrasjon standarden til ca. 200 tellinger/min. når det gjaldt 10 ng/ml T4-standarden (det vil si ved $^{125}\text{I}:^{131}\text{I}$ -forhold innen området 10:1 til 1:1). Det ble igjen bekreftet i en ytterligere serie forsøk a. at 5 gangers variasjonen i mengden fastfaset antistoff som ble benyttet ikke påvirket form og posisjon for dosisresponskurven, og b. at sammenlignbare faktorielle økninger i volumet av standard T4-oppløsningene heller ikke påvirket kurven. Disse resultater viser at systemet er uavhengig av prøveløstet og antistoffkonsentrasjonen. Systemet ble derefter benyttet for å analysere T4-ekstraktene oppnådd som beskrevet ovenfor i det $^{125}\text{I}:^{131}\text{I}$ -forholdsverdiene for de ukjente stoffer ble sammenlignet med standardkurven på vanlig måte og resultatene sammenlignet med de som ble oppnådd i en konvensjonell T4-analyseprosedyre. Resultatene var meget sammenlignbare idet overensstemmelsen vanligvis lå innen 5% og sjelden var dårligere enn 10%.

Eksempel 2.

Opprettelse av en dual fluorescens T4-analysemetode.

Eksempel 1 viser den rute som tas for å opprette en brukbar "dual merkelappforhold" kompetitiv immunoanalysemetode. Å benytte en fluorescein-merkelapp i stedet for ^{125}I for merking av T4 og en rhodamin-merkelapp i stedet for ^{131}I for å merke anti-T4-antistoff har muliggjort å bygge opp en analog dual fluorescens-forhold immunoanalysemetode. Merkingen av antistoffet og T4 med disse fluorescent merkelapper ble gjennomført ved konvensjonelle metoder "Immunochemistry in Practice", A. Johnston og R. Thorpe, Blackwell Scientific Pub. (1982). For imidlertid å understøtte valget av korrekte reaksjonskonsentrasjoner ble disse forsøk gjennomført ved bruk av dualmerket antistoff (det vil si merket med ^{133}I og rhodamin) og dualmerket T4 (det vil si

merket med ^{125}I og fluorescein). Videre ble antistoffet belagt (ved adsorpsjon) på små polystyrenskiver i stedet for kovalent bundet til mikrocellulose som beskrevet i Eks. 1, ved bruk av velkjente teknikker for belegning av polystyren. I dette tilfelle ble T4-konsentrasjonen som er til stede i de ukjente prøver bestemt fra rhodamin:fluorescein-fluorescensforholdet ved bruk av et Perkin Elmer type LF-5 luminescensspektrometer (fluorimeter) for å måle fluorescenssignalene sekvensielt. De således oppnådde resultater ble igjen sammenlignet med de som var basert på målinger av isotopforholdet som beskrevet i Eks. 1 og med en konvensjonell T4-analyseprosedyre, og igjen ble det oppnådd tilfredsstillende overensstemmelse.

Eksempel 3.

Oppbygging av en dual fluorescens T4-analysemetode som involverer tidsoppløst pulsfluorescens.

I stedet for å merke T4- og anti-T4-antistoffet med fluorescein og rhodamin som i Eks. 2 ble de merket henholdsvis med terbium- og europium-chelater med EDTA, koblet på antistoffet på kjent måte. Signalforholdet ble målt ved kjente puls-lys fluorescenssteknikker ved bruk av et kjent tidsoppløsende fluorimeter og resultatene som ble oppnådd med den ukjente prøve ble sammenlignet med kalibreringskurven oppnådd med standardoppløsninger. Igjen ble det oppnådd tilfredsstillende overensstemmelse med resultater oppnådd ved hjelp av andre metoder.

Eksempel 4.

Et sett for bruk ved bedømmelsen av RSH (thyrotrofin) i henhold til oppfinnelsen, består av følgende komponenter:

a) et monoklonalt anti-TSH antistoff som kommersielt er tilgjengelig fra Department of Endocrinology, Middlesex

Hospital Medical School, Mortimer Street, London, er immobilisert på en fast plate og merket med fluorescein.

5 b) standardoppløsninger inneholdende 0,2, 1,0, 5,0, 20,0 og 100 mikro-internasjonale enheter av TSH pr. mol.

10 c) tilbaketitreringsreagensen er på samme måte et kommersielt tilgjengelig anti-TSH monoklonalt antistoff, denne gang merket med et europium(III)chelat med kobber(II)trifluoracetylaceton og formaldehyd på en måte tilsvarende det som er foreslått i WO 86/01604. Det første antistoffet er permanent fluorescent og det andre i stand til bedømmelse ved tidsopløst pulsfluorescent.

15 Et slikt sett kan benyttes for estimering av TSH ved hjelp av en prosedyre tilsvarende det som er beskrevet i eksemplene 1 - 3 idet mengden anti-TSH-antistoff og størrelsen av prøven som inneholder TSH velges relativt hverandre slik at ca. 5% eller mindre TSH i prøven bindes til anti-TSH-antistoffet på platen. 20 Tilbaketitreringen involverer et ikke-kompetitivt system i stedet for et kompetitivt system men er i prinsippet den samme.

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

Immunoanalyse for bestemmelse av konsentrasjonen av en analytt i en ukjent væskeprøve, omfattende å bringe prøven i kontakt med et reseptormolekyl med bindings seter for analytten og merket med en første markør, hvorved en andel av bindings setene av reseptormolekylet er opptatt av analytten, tilbaketitrering av reseptoren med fraksjonelt opptatte bindings seter ved hjelp av en tilbaketitreringsteknikk som involverer et system som inkluderer en andre markør forskjellig fra den første, måling av de relative styrker av de to signaler som fremstilles av de to markører for å oppnå en verdi representativt for den fraksjonelle opptatthet av bindings setene på reseptormolekylet på grunn av analytten, og sammenligning av denne verdi med en eller flere tilsvarende verdier oppnådd på samme måte ved bruk av en eller flere standardvæskeprøver av kjent analyttkonsentrasjon,

k a r a k t e r i s e r t v e d at de ukjente og standardvæskeprøvene hver bringes i kontakt med en så liten mengde av reseptoren, avhengig av affinitetskonstanten med analytten, at ikke mer enn 5% av analytten bindes til reseptoren.

2.

Immunoanalyse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at markørene er fluorescente markører.

3.

Immunoanalyse ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilbaketitreringsteknikken involverer et kompetitivt system inkludert en tilbaketitreringsreagens valgt blant analytten merket med en markør og et annet materiale i stand til å oppnå kun de ikke opptatte analytt-bindings seter på reseptormolekylet og merket med en markør.

4.

Immunoanalyse ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at tilbaketitreringsteknikken involverer
et ikke kompetitivt system inkludert en tilbaketitreringsrea-
5 gens som er i stand til å binde med den bundne analytt eller
kun med reseptormolekylbindingssetene som er opptatt av den
bundne analytt og som allerede er merket eller senere er
merket med en markør.

10 5.

Immunoanalyse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ubetydelige andel
er mindre enn 2% av den totale mengde av tilstedeværende
analytt.

15 6.

Immunoanalyse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at reseptoren er et
antistoff for analytten.

20 7.

Immunoanalyse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at analytten er et
hormon.

25 8.

Immunoanalyse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at prøven inneholdende
analytten ikke inneholder analytten reversibelt bundet til et
30 bindingsmiddel.

9.

Immunoanalyse ifølge et hvilket som helst av kravene 2 til 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at markørene er
35 forskjellige lanthanidechelater som blir fluorescente kun ved
aktivering og at fluorescensen anslås ved tidsoppløst

pulsfluorescens involvert scandering med en høyintensitets lysstråle.

10.

5 Sett for bruk i en immunoanalyse ifølge kravene 1-9 for å
bestemme konsentrasjonen av en analytt i en væskeprøve,
k a r a k t e r i s e r t v e d at settet omfatter et
fast substrat med dertil festede molekyler av en reseptor
merket med en første, fortrinnsvis fluorescent markør og med
10 bindings seter for en analytt, idet mengden reseptor på
substratet velges i henhold til størrelsen av væskeprøven
slik at bare 5% av analytten i prøven blir bundet til
reseptoren, idet en eller flere standardoppløsninger
inneholdende kjente konsentrasjoner av analytten og en
15 tilbaketitreringsreagens merket med en andre, fortrinnsvis
fluorescent markør som er forskjellig fra den første og i
stand til å binde direkte eller indirekte enten ved den
bundne analytt eller ved bindingssetene som opptas av den
bundne analytt, for å binde med bindingssetene som ikke er
20 opptatt av den bundne analytt.

11.

Sett ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d
at det inkluderer en analytisk anordning omfattende et
25 langstrakt fast substrat med et antall i avstand anordnede
lokaliteter med et antall forskjellige reseptorer som hver
har bindings seter på sitt molekyl for en analytt, der
reseptoren på enhver lokalisering har bindings seter som er
spesifikke for en analytt forskjellig fra den analytt for
30 hvilken reseptoren på en eller flere andre lokaliteter har
spesifikke bindings seter, idet hver av reseptorene eventuelt
er merket med en markør.

1/4

