



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: G 01 N 33/543 G 01 N 33/574 G 01 N 33/577

(21) Patentansøgning nr: PA 1988 05502

(22) Indleveringsdag: 1988-09-30

(24) Løbedag: 1988-09-30

(41) Alm. tilgængelig: 1989-03-31

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2002-04-29

(30) Prioritet: 1987-09-30 FR 8713537

(73) Patenthaver: **SANOFI-SYNTHELABO**, 174 avenue de France, 75013 Paris, Frankrig

(72) Opfinder: **Dominique Carriere**, Lotissement La Colline No 29, 34160 Castries, Frankrig

(74) Fuldmægtig: **Chas. Hude A/S**, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark

(54) Benævnelse: **Sæt samt fremgangsmåde til immunometrisk dosering, der kan anvendes på hele celler**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

Opfindelsen angår et udstyr til bestemmelse af overfladeantigener, der er karakteristiske for en population eller underpopulation af celler omfattende som bestanddele:

a) en fast bærer, hvorpå der er fikseret ved covalent binding eller ved fysisk adsorption et eller flere monoklonale antistoffer rettet mod overfladeantigener på cellepopulationen som skal bestemmes,

b) en eller flere opløsninger, der hver indeholder et monoklonalt antistof, der er specifikt for populationen eller underpopulationen af celler, som skal bestemmes, og som er markeret med en radioisotopsonde eller en enzymatisk sonde,

c) hvor det drejer sig om antistof mærket med en enzymatisk sonde, en eller flere opløsninger med de reagenser, der er nødvendige (substrat og chromogen) til at afsløre enzymaktiviteten.

Opfindelsen angår ligeledes en fremgangsmåde til immunometrisk bestemmelse af overfladeantigener på en population eller underpopulation af celler.

Bestemmelsesudstyret og den immunometriske fremgangsmåde ifølge opfindelse kan anvendes til total bestemmelse af populationen af T-lymfocytter og/eller underpopulationer af lymfocytterne T4 og T8.

- Den foreliggende opfindelse angår et udstyr og en fremgangsmåde til immunometrisk bestemmelse under anvendelse af dette udstyr til bestemmelse af overfladeantigener, der er karakteristiske for cellepopulationer eller celleunderpopulationer.
- 5 Fremgangsmåden til immunometrisk bestemmelse og det tilsvarende udstyr er ligeledes beregnet til bestemmelse af cellerne selv ved mellemliggende bestemmelse af deres overfladeantigener. Disse bestemmelser er anvendelige i diagnostikken.
- 10 Kendskabet til antigener eller markører på celleoverfladen har gjort store fremskridt med den praktiske anvendeliggørelse af lymfocythybridisering og opdagelsen af monoklonale antistoffer af Koehler og Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497). De monoklonale antistoffer har især muliggjort anskueliggørelse
- 15 og analyse af overflademarkører eller membranantigener på celler af de mest forskelligartede oprindelser. Disse markører (eller antigener) kan være af forskellige karakter: proteiner, glycoproteiner eller glycolipider. De tilstræbte karakteriseringer gælder hovedsagelig vævsmarkører eller organmarkører,
- 20 markører af differentieringstilstande eller aktiveringstilstande af normale celler og identifikation eller typebestemmelse af normale celler eller cancerceller. Et særligt vigtigt anvendelsesområde er undersøgelse af bloddannescellelinier (erythrocyt, megakaryocyt, granulocyt, monocyt, lymfocyt).
- 25 De monoklonale antistoffer har således f.eks. muliggjort at fastsætte de respektive overfladeegenskaber af lymfocytterne T og B. De tilsvarende markører alene eller i kombination identificerer differentieringsstadier og funktionelle specialiseringer af lymfocytter. Ifølge international konvention er leu-
- 30 kocytternes overflademarkører blevet klassificeret i grupper eller differentieringsklasser (CD) defineret af underkomiteen IUIS-OMS, 1984 og beskrevet i Verdenssundhedsorganisationens Bulletin 1984, 62 (5), 813-815.
- 35 Identifikationen af disse markører, der er muliggjort i kraft af monoklonale antistoffer, har gjort det muligt at nå frem til deres struktur og deres biologiske funktioner. Molekyler-

ne af markørerne CD4 og CD8 tager f.eks. del i leukocytadhæ-
sionsfunktioner og befinder sig på overfladen af T-lymfocytter
og har henholdsvis en hjælpefunktion og induktionsfunktion
(markør CD4) eller en cytotoxisk og undertrykkende funktion
5 (markør CD8).

Etableringen af denne viden har gjort det muligt at udnytte
disse markører takket være de antistoffer, som de genkender,
til at diagnosticere og følge forskellige patologier især ma-
10 lige hæmopatier (leukæmier, lymfomaer osv.) og tilstande af
funktionsforstyrrelser af immunsystemet (autoimmunsygdomme,
medfødte eller erhvervede immunologiske mangler, såsom SIDA
osv.) (BRETON-GORIUS et VAINCHENKER, *Le Biologiste*, 1987, XXI,
nr. 167, 63-70, SHAW, *Immunology today*, 1987, 8 (1), 1-3).

15

Monoklonale antistoffer er i dag uerstattelige værktøjer for
den anvendte kliniske biologi til analyse af celler.

Der findes fremgangsmåder til optælling af celler, som udnyt-
20 ter mærkningen af deres overfladeantigener, men disse frem-
gangsmåder er ofte langvarige, komplicerede og vanskelige at
udføre, og deres resultater er undertiden usikre.

De kendte fremgangsmåder, der anvendes til at måle den norma-
25 le eller modificerede ekspression af antigenerne på overfladen
af cellen, kan opdeles i to grupper. I den første gruppe måles
antigenerne ved hjælp af kompliceret og specialiseret labora-
torieudstyr, der er baseret på strømningscytometri (se især
PONCELET med flere, *J. Immunol. Methods*, 1985, 85, 65-74) el-
30 ler de kvantitative mikroskopiteknikker (POULTER med flere, *J.*
Immunol. Methods, 1987, 98, 227-234). Udførelsen af disse be-
dømmelsesmetoder for cellens antigener er baseret på måling af
signaler, der bæres af anticelleantistoffer koblet direkte
eller indirekte til en reaktionsdygtig markør med fluoresce-
35 rende stoffer (eller fluorochromer), såsom fluoresceinisothio-
cyanat eller rhodamin, eller enzymer såsom peroxydase eller
alkalisk phosphatase. Anvendelse af disse fluorescerende rea-
genser eller enzymatiske reagenser sammen med passende vaske-

trin fører så til fremkomst af fluorescenser eller farvninger, der er nøje begrænset til cellemembranerne og ikke spredes i det omgivende miljø. Den nuværende anvendelse af disse laboratoriemetoder er begrænset af nødvendigheden af et kostbart og specialiseret apparatur (fluorescensmikroskop eventuelt sammen med en billedanalysator, cryostat og strømningscytometer). Analysen og fortolkningen af immunomarkeringerne af cellerne ved disse fremgangsmåder nødvendiggør desuden en cytologisk specialists kompetence.

10

En anden gruppe fremgangsmåder til måling af antigener er baseret på den kvantitative bedømmelse af markører af den samlede cellepopulation. Disse fremgangsmåder muliggør måling af antigener med et mærke enten direkte eller indirekte, som så udføres hyppigst i to, tre eller fire trin. I alle tilfældene bærer det anvendte reagens fra det sidste markeringstrin en sonde, som er enten af isotop karakter f.eks. jod 125 til en radioimmunbestemmelse (BROW med flere, J. Immunol. Methods, 1979, 31, 201 - STOCKER et HEUSSER, J. Immunol. Methods, 1979, 26, 87-95) eller et enzym til en bestemmelse af enzymometrisk type, som oftest peroxydase, alkalisk phosphatase eller β -galaktosidase (VAN LEUVEN med flere, J. Immunol. Methods, 1978, 23, 109-116 - MORRIS Transplantation, 1983, 36 (6), 719 - BAUMGARTEN, J. Immunol. Methods, 1986, 94, 91-98).

25

Fremgangsmåderne i denne sidstnævnte gruppe er temmelig upraktiske, besværlige og farlige at anvende på grund af nødvendigheden af talrige vaskninger og centrifugeringer af cellemateriale. Det er undertiden nødvendigt at udtage det farvede medium, der fremkommer ved den enzymatiske reaktion med henblik på den endelige spektrofotometriske måling. Endelig er den kemiske fiksering af cellerne, som oftest anvendes, årsag til irreversibel ødelæggelse af visse antigener, der er særligt følsomme for sædvanlige kemiske fikseringsmidler, såsom glutaraldehyde eller methanol (DROVER med flere, J. Immunol. Methods, 1986, 90, 275-281).

35

Det er kendt fra litteraturen, at man kan bestemmes et antigen, der bærer flere antigene determinanter, dvs. flere epito-

per ved at fiksure dette antigen med en af dets epitoper i kraft af et antistof immobiliseret på en fast bærer, og ved at binde til en anden epitop af antigenet et andet antistof, som bærer en enzymatisk markør eller radioisotopmarkør, som mulig-
5 gør måling.

En sådan teknik, der ofte kaldes sandwichteknik, er især beskrevet i de franske patentansøgninger nr. 2.487.983, 2.500.166 og EP 119.736. Ingen af disse dokumenter beskriver anvendelse af denne teknik til hele celler, selv om ordet "celle"
10 undertiden er indbefattet i den liste over antigener, som processen kan anvendes til.

I de ovennævnte patenter er de forskellige antigener, der er genstand for eksemplerne, alle udelukkende proteinmolekyler, der er opløselige i vand og fysiologiske væsker, såsom hormoner, enzymer eller cirkulerende tumormarkører. I modsætning hertil er det klart, at en celle ikke er et molekyle og adskiller sig i det mindste ved en betydeligt større størrelse
15 og ved at den ikke er opløselig i fysiologiske medier. Indtil i dag har sandwichteknikken derfor aldrig været anvendt på hele celler.

I øvrigt er immunoindfangning af celler på en fast bærer beskrevet i patentansøgning WO 86/02091, hvor formålet er at fjerne uønskede celler i prøver af knoglemarv beregnet til transplantationer. Ifølge denne patentansøgning udføres indfangningen af cellerne på flydende mikrokugler og nødvendig-
25 gør, at det anvendte antistof er forbundet med den faste bærer med en kompleks makromolekylær struktur kaldet netrelæ, som er i stand til at sikre en begunstiget orientering af antistoffet i forhold til det tilsvarende celleantigen. I denne ansøgning er der ikke vist nogen anvendelse af teknikken til kvantitativ bestemmelse af et antigen.
30

35 Immunoindfangning af celler er ligeledes beskrevet i ansøgning WO 84/03151 til en analytisk anvendelse. I denne ansøgning er formålet at identificere vævstyper, som de undersøgte celler

tilhører (en operation, der i almindelighed kaldes typebestemmelse HLA). Indfangningen af cellerne sker i kraft af antistoffer, der befinder sig efter en særlig geometri på meget specialiserede bærere (mikroskoplameller). Resultaterne fås ved simpel visuel iagttagelse af bæreren og fører til svarene alt eller intet. De hidtil beskrevne systemer til immunoindfangning af celler fører således ikke til analytiske anvendelser, der muliggør kvantitativ bestemmelse af et antigen udtrykt på membranen af bestemte celler. Endvidere kan alle disse systemer mangle specificitet, for de er baseret på genkendelse af celler af et enkelt antistof.

Bestemmelsesmetoden, som er genstand for den foreliggende opfindelse, har betydelige fordele sammenlignet med alle de tidligere kendte og anvendte teknikker, for den gør det muligt at måle på kvantitativ måde alt antigen i en cellepopulation i et enkelt analysetrin. Denne bestemmelse udføres på celler, som ikke underkastes noget kemisk eller fysisk indgreb, og som er i deres fuldstændige fysiologiske tilstand. Endvidere har bestemmelsesmetoden ifølge opfindelsen ejendommelighederne ved meget høj specificitet, som er særegen for systemer med dobbelt immunologisk genkendelse, som udnytter 2 forskellige antistoffer, der er specifikke for 2 forskellige antigener båret af samme celle. Denne fremgangsmåde er enkel, hurtig og reproducerbar. Den er helt egnet til analyse af et stort antal prøver, hvilket muliggør dens udnyttelse til diagnostiske formål i kliniske, biologiske laboratorier med stort udbytte.

Den foreliggende opfindelse angår således et udstyr til immunometrisk bestemmelse af mindst ét overfladeantigen, som er karakteristisk for en population eller underpopulation af celler, og som omfatter som bestanddele:

a) en fast bærer, hvorpå der ved covalent binding eller ved fysisk adsorption er fikseret et eller flere monoklonale antistoffer rettet mod overfladeantigener af den undersøgte cellepopulation udover nævnte karakteristiske antigen og beregnet til på bæreren at immobilisere cellerne, hvoriblandt findes

celler af underpopulationen, som bærer antigenet, der skal bestemmes;

5 b) mindst én opløsning omfattende et specifikt monoklonalt antistof for det karakteristiske antigen i cellepopulationen eller celleunderpopulationen, som bærer antigenet der skal bestemmes, og som er mærket med en radioisotopsonde eller enzymatisk sonde;

10 c) hvor det drejer sig om monoklonale antistoffer mærket med en enzymatisk sonde, et enzymrøbestof, nemlig en eller flere opløsninger indeholdende enzymsubstratet og i givet tilfælde et eller flere reagenser, der er nødvendige til at afsløre enzyms aktivitet.

15

Udtrykket celle anvendt i den foreliggende beskrivelse og kravene indbefatter menneskeceller, dyreceller, protozoceller og mikroorganismeceller (bakterier eller svampe). Hvad angår blodcellerne indbefatter opfindelsen kerneholdige formede elementer, såsom leukocytter og formede elementer uden kerne, såsom røde blodlegemer eller blodplader.

20

Bestemmelsesmetoden ifølge opfindelsen er anvendelig til hele celler, dvs. ikke-lysende celler.

25

Cellerne har ikke undergået noget fysisk eller kemisk indgreb, og de anvendes i en tilstand af fuldstændig fysiologisk helhed. Denne situation udgør den bedste garanti for integritet af de som bestemmelsesmål valgte membranmarkører.

30

Som fast bærer kan man anvende ethvert system, der er egnet til manipulation af celleduspensioner og fortrinsvis reagensglas, partikelformede magnetiske bærere eller stive eller bløde mikrotitreringsplader af polyethylen, polystyren, polyvinylchlorid eller nitrocellulose, som har mikrofordybninger. De monoklonale antistoffer beregnet til immobilisering af cellerne kan være fikseret på de faste bærere enten ved covalent kemisk binding eller ved fysisk adsorption efter den klassiske

35

velkendte teknik, såsom den der er beskrevet af STOCKER og HEUSSER, J. Immunol. Methods, 1979, bind 26, side 87-95. Med fordel kan bæreren forud være mættet ved hjælp af et protein.

5 Ifølge opfindelsen skal det eller de monoklonale antistoffer, som er fikseret på den faste bærer, muliggøre indfangning af cellepopulationen, i hvilken der findes den eller de cellepopulationer, som bærer antigenerne, der skal bestemmes. Når denne population udgøres af humane celler, er de foretrukne
10 monoklonale antistoffer til indfangningen antistofferne anti-HLA af klasse I, som er specifikke for den fælles del af antigenerne HLA A, B og C, som findes på leukocytterne, og for talrige andre af organismens cellelinier. Blandt disse antistoffer foretrækkes især de, der kaldes S-klasse I, der for-
15 handles af BIOSYS.

I andre tilfælde, hvor de undersøgte celler er humane celler, og i alle tilfælde, når cellerne ikke er humane, kan monoklonale antistoffer passende til den undersøgte celletype lige-
20 ledes anvendes til immunoindfangning ifølge opfindelsen.

Udtrykket "et monoklonalt antistof mærket med en radioisotopsonde" betegner, at det monoklonale antistof bærer enten på et passende element i strukturen f.eks. de indgående tyrosinre-
25 ster eller på et passende radikal, som er blevet fikseret derpå, en radioaktiv isotop, som gør det muligt at bestemme den ved tælling af den dermed forbundne radioaktivitet.

Udtrykket "et monoklonalt antistof mærket med en enzymatisk
30 sonde" betyder, at det monoklonale antistof er koblet med et enzym, som sammen med anvendelse af passende reagenser muliggør en kvantitativ måling af dette monoklonale antistof.

Substratet og reagenserne vælges således, at det endelige re-
35 aktionsprodukt eller det endelige produkt fra rækkefølgen af reaktioner fremkaldt med enzymet, og som benytter disse stoffer, er:

enten et farvet eller fluorescerende stof, som diffunderer i det flydende medium, som omgiver cellerne, og som er genstand for den endelige spektrofotometriske eller fluorimetriske måling,

5

eller et farvet stof, der er uopløseligt, og som aflejrer sig på cellerne og væggene, hvorpå de er fikseret, og som kan gøres til genstand for enten en fotometrisk måling ved refleksion eller en visuel bedømmelse eventuelt i forhold til en kalibreret farveskala.

10

Bestemmelsesudstyret kan som yderligere bestanddel indeholde en stødpudeopløsning beregnet til vask af den faste bærer efter immobilisering og mærkning af cellerne med det eller de antistoffer, som bærer den valgte sonde.

15

Bestemmelsesudstyret kan også indeholde som yderligere bestanddele de prøver, som er nødvendige til kalibrering af bestemmelsen og til kontrol af kvaliteten af bestemmelsen.

20

Opfindelsen angår ligeledes en fremgangsmåde til immunometrisk bestemmelse af overfladeantigener på en cellepopulation eller celleunderpopulation, som er ejendommelig ved, at den omfatter:

25

et enkelt trin til specifik immobilisering eller immunoindfangning af en cellepopulation på den faste bærer under anvendelse af et eller flere monoklonale antistoffer, der forud er fikseret ved covalent binding eller ved fysisk adsorption på bæreren og i stand til at genkende et antigen, der findes på overfladen af cellerne, udover det antigen som skal bestemmes og samtidig direkte mærkning af overfladeantigenet, der skal bestemmes, og som hører til den immobiliserede cellepopulation eller til en af dens underpopulationer, med et monoklonalt antistof, der er specifikt for dette antigen, der skal bestemmes, hvilket monoklonale antistof bærer en radioisotopsonde eller alternativt enzymatisk sonde,

30

35

en inkubationsperiode for at tillade immunoindfangning og samtidig mærkning,

vask af den faste bærer for at fjerne uønskede celler eller ikke-immobiliserede celler og overskud af monoklonalt antistof, som bærer den radioisotope eller enzymatiske sonde,

egentlig måling af antigenet, der skal bestemmes, i den mærkede cellepopulation eller celleunderpopulation ved tælling af den fikserede radioaktivitet eller alternativt efter behandling af mediet med substratet for enzymet og eventuelt et eller flere passende hjælpereagenser, ved transmissionsfotometrisk eller reflektionsfotometrisk måling eller ved måling af fluorescensemissionen.

15

Bestemmelsesudstyret og den immunometriske fremgangsmåde ifølge opfindelse anvendes fortrinsvis til bestemmelse af overfladeantigener af formede elementer af humant blod, især leukocytter, og specielt lymfocytter, T-lymfocytter, T4-lymfocytter, T8-lymfocytter, B-lymfocytter samt granulocytter, monocytter og blodplader.

20

En anden foretrukken anvendelse er bestemmelse af overfladeantigenerne på patogene mikroorganismer, f.eks. *Candida albicans*.

25

Desuden er bestemmelsesudstyret og den immunometriske fremgangsmåde ifølge opfindelsen især anvendelig til bestemmelsen af overfladeantigener på tumorceller, især cancerceller fra urinvejene og ondartede hæmopaticeller.

30

Bestemmelsesudstyret og den immunometriske fremgangsmåde ifølge opfindelsen gør det muligt at måle signaler (radioaktivitet eller absorberet eller udsendt lys), som afhænger både af antallet af celler, der findes i den undersøgte cellepopulation, og af den målte antigen-tæthed på overfladen af cellerne. Måling af disse signaler tillader en kvantitativ bedømmelse af det totale antal molekyler af dette antigen, som bæres af den

35

undersøgte cellepopulation eller celleunderpopulation, hvori dette antigen har en strukturel eller funktionel rolle.

Hvor det drejer sig om leukocytmarkører, der er særlig betyd-
5 ningsfulde i hæmatologien, ved man f.eks., at hos sunde indivi-
vider i det fleste situationer varierer middelværdien af an-
tigentætheden ikke særlig meget fra en prøve til en anden for
samme cellepopulation. Der eksisterer så en god korrelation
10 mellem den cytologiske tælling af cellerne, som bærer det på-
gældende antigen, og det signal som måles ifølge opfindelsen,
som er proportionalt med antallet af antigenmolekyler, der
findes i den undersøgte prøve. I visse patologiske tilstande
kan tætheden af overfladeantigener tværtimod variere for sam-
me cellepopulation, uden at antallet eller mængden af positive
15 celler varierer særligt. Sådanne patologiske tilstande påvises
mere effektivt ved anvendelse af den immunometriske fremgangs-
måde ifølge opfindelsen eller ved anvendelse af udstyret iføl-
ge opfindelsen end ved en sædvanlig fremgangsmåde til cytol-
gisk tælling.

20

En anden anvendelse af opfindelsen fås ved som fast bærer at
vælge en mikrotitreringsplade. Bestemmelsesudstyret og den im-
munometriske fremgangsmåde ifølge opfindelsen kan så med for-
25 del udnyttes til bestemmelse på en enkelt plade af en række
overfladeantigener, der er karakteristiske for forskellige un-
derpopulationer, som udgør den undersøgte cellepopulation. Til
denne anvendelse kan man anvende på den ene side mikrotitre-
ringsplader parat til anvendelse, hvorpå der er fikseret på
forhånd et eller flere monokonale antistoffer, som er i stand
30 til at tilbageholde alle cellerne af den undersøgte population
og på den anden side anbringe en række monoklonale antistof-
fer, koblet til en passende markør, og som hver er specifikke
over for et antigen, der er karakteristisk for en af de under-
populationer, der skal bedømmes. Ved en enkelt manipulation og
35 på samme bærer kan man således opnå kvantitativ bestemmelse af
alle de antigener, der er nødvendige til karakterisering af de
valgte underpopulationer.

Denne anvendelse af den foreliggende opfindelse illustreres af karakteriseringen af den antigene udrustning af celler, der har interesse i klinisk biologi. Et første tilfælde repræsenteres af bestemmelsen af vævsgrupper, som karakteriserer et givet individ, og som er kendt under den sædvanlige betegnelse typebestemmelse HLA.

Et andet tilfælde repræsenteres af typebestemmelsen af tumorceller, især for syge der når maligne hæmopatier såsom leukæmier og lymfomaer. Denne diagnostiske undersøgelse, der praktiseres systematisk, består i at karakterisere typen og oprindelsen af patientens tumorceller ved tilstedeværelsen eller fraværet på cellerne af en række overfladeantigener, der vælges passende.

15

Ved at anvendes udstyret ifølge opfindelsen, som omfatter en mikrotitreringsplade, hvorpå der på forhånd er fikseret et eller flere monoklonale antistoffer, som er i stand til at fikser alle cellerne af den undersøgte population, og opløsninger af forskellige monoklonale antistoffer mærket med en enzymatisk eller radioisotopsonde, der hver er specifik for et antigen, der findes på tumorcellerne, kan man identificere og kvantitativt bedømme de antigener, der er karakteristiske for patientens population af tumorceller, og derved henføre dem til en af de store cancergrupper og især maligne hæmopatier, der karakteriseres klinisk. Anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen gør det således muligt på en enkelt bærer hurtigt at udføre en kvalitativ og kvantitativ undersøgelse af tumorcellernes antigene udrustning.

30

Til illustration af en anden anvendelse af opfindelsen kan nævnes tilfældet med humane T-lymfocytter, af hvilke der eksisterer især 2 underpopulationer af celler: lymfocytter, der er karakteristiske ved tilstedeværelsen af markøren CD4, som man kalder positive T4-lymfocytter eller blot T4-lymfocytter, og lymfocytter der er karakteristiske ved tilstedeværelse af markøren CD8, og som man kalder positive T8-lymfocytter (eller T8-lymfocytter).

Måling af det numeriske forhold T4/T8 har stor diagnostisk interesse i den kliniske biologi. Det er faktisk kendt, at ændringer i forholdet T4/T8 forekommer ved forskellige påvirkninger af immunsystemet, såsom immunforstyrrende sygdomme, kroniske infektionssygdomme, virale infektioner og især HIV-sygdomme (SIDA-virus).

Bestemmelsesudstyret og den immunometriske fremgangsmåde ifølge opfindelsen kan anvendes til bestemmelse af antigener, der samlet er karakteristiske for populationen af T-lymfocytter og/eller antigener, der er karakteristiske for underpopulationer af T4- og T8-lymfocytter. I dette tilfælde udfører man specifik immobilisering af T-lymfocytter fra den undersøgte prøve på en fast bærer, og samtidig udfører man direkte mærkning af overfladeantigener på T4-lymfocytterne med et monoklonalt antistof anti-CD4 som bærer en radioisotop eller enzymatisk sonde. På samme måde udfører man direkte mærkning af overfladeantigener på T8-lymfocytter med et monoklonalt antistof anti-CD8, som bærer en passende sonde.

20

Til bestemmelse af totale T-lymfocytter anvender man fortrinsvis et monoklonalt antistof anti-CD7 (ligeledes betegnet anti-T2), som bærer en passende sonde.

For at få specifik immobilisering af prøvens T-lymfocytter anvendes fortrinsvis et eller flere monoklonale antistoffer, der er i stand til alene eller i kombination at genkende alle prøvens T-celler, hvilket er tilfældet med de almindelige anti-leukocyt antistoffer (eller anti-CD45) eller antistoffer, som genkender hele T-populationen (kaldet "pan T"), såsom antistofferne anti-CD2 (eller anti-T11), anti-CD5 (eller anti-T1), anti-CD7 (eller anti-T2) eller andre pan-T antistoffer, som endnu ikke er henført til en differentieringsklasse ifølge OMS-kriterierne.

35

Man kan med fordel anvende den immunometriske fremgangsmåde ifølge opfindelsen til bestemmelse af antigener, der er karakteristiske for populationen af T-lymfocytter og T4- og T8-lym-

focytter på flere dele af samme faste bærer. Måling af signa-
lerne ved tælling af radioaktivitet, fotometrisk måling i
transmission eller refleksion eller fluorescensmåling gør det
muligt let og direkte at beregne det numeriske forhold
5 CD4/CD8.

På samme måde kan man på samme faste bærer bestemme de under-
populationer, der kaldes T-lymfocytter og B-lymfocytter, og
som udgør hele lymfocytrækken.

10

Man kan f.eks. ved adsorption fikser et monoklonalt antistof
eller en blanding af monokonale antistoffer, der er specifik-
ke for alle overfladeantigenerne på T-celler, på væggene af
mikrofordybninger. Disse monokonale antistoffer gør det mu-
15 ligt senere at immobilisere i mikrofordybningerne hele popu-
lationen af T-celler i den undersøgte prøve. Plader der er
fremstillet på denne måde kan lyofiliseres og oplagres for-
trinsvis ved 4°C. Dette trin kan udføres industrielt, og man
kan således råde over plader, der er parate til anvendelse til
20 bestemmelsesudstyr, der er anvendeligt enten til totale T-lym-
focytter eller til enhver underpopulation af T-lymfocytter.

Prøver indeholdende celler, der skal bestemmes, og som stammer
fra blod eller en anden passende biologisk væske, hvad enten
25 den er normal eller patologisk, kan anvendes som de er eller
efter tilberedning især ved vægtfyldegradientcentrifugering på
kendte måder og især i medium af kraftig vægtfylde, som f.eks.
FICOLL-PAQUE, der forhandles af Pharmacia. Til bestemmelse af
blodlymfocytter kan man ligeledes behandle blodprøven, der
30 skal bestemmes, med en opløsning kalde lysestødpude, som lyser
de røde blodlegemer.

Lige store dele af celledisuspensionen anbringes i kontakt med
den faste bærer, f.eks. i mikrofordybninger i en mikrotiter-
35 plade, der forud er tilberedt, samtidig med opløsningen som
udgør en del af bestemmelsesudstyret, og som indeholder det
monoklonale antistof, der er specifikt for den tilsigtede cel-
lepopulation, og som bærer en passende sonde, dvs. et radio-

isotop eller enzymatisk sporstof. Således kan en radioisotopsonde realiseres f.eks. ved mærkning af det monoklonale antistof med jod 125 eller jod 131, f.eks. i nærværelse af chloramin T på kendt måde (F.C. GREENWOOD, W.M. HUNTER med flere, 5 Biochem. J., 1963, 89, 114), eller en enzymatisk sonde kan realiseres ved at forbinde det monoklonale antistof med et enzym, såsom alkalisk phosphatase, peroxydase, β -galaktosidase eller acetylcholinesterase på i og for sig kendte måder (se 10 f.eks. M. O'SULLIVAN, Methods in Enzymology, 1981, 73, 147) eller efter en metode, som udledes heraf. For at undgå visse ubekvemmeligheder, der er forbundet med manipulation af radioaktive stoffer og med den begrænsede varighed af reagensernes gyldighed, anvendes i visse tilfælde enzymerne fremfor radioisotope sonder.

15

Inkubationsperioden, dvs. den tid, der er nødvendig til immobiliseringen og den samtidige markering af cellerne, er fortrinsvis mindre end eller lig med 1 time. I denne tid kan den faste bærer eventuelt centrifugeres for at forbedre immobiliseringen af cellerne. Den faste bærer, f.eks. mikrotitreringspladen, bliver derefter vasket for samtidig at fjerne ikkefikserede celler og overskud af monoklonalt antistof, som 20 bærer en enzymatisk eller radioisotopsonde.

25 Når man anvender en radioisotopsonde f.eks. jod 125, bliver radioaktiviteten, der er forbundet med cellerne, talt i en gammataæller på enhver passende måde, og f.eks. efter opløseliggørelse af cellerne med en alkalisk opløsning (f.eks. en natriumhydroxidopløsning) og genvinding af opløsningen indeholdende radioaktiviteten ved hjælp af en absorberende stødpude. 30

Når man anvender en enzymatisk sonde til det monoklonale antistof, fås der fremkomst af et farvet eller fluorescerende produkt ved til den faste bærer, hvorpå der er fikseret cellepopulationen, som bærer antigenet, der skal bestemmes, at sætte 35 en opløsning indeholdende enzymsubstratet og et eller flere hjælpereagenser, som gør det muligt til slut som reaktions-

produkt at få enten et farvet produkt, der er opløseligt i mediet, eller et farvet produkt, der er uopløseligt eller et opløseligt fluorescerende produkt, således som det er forklaret i det foregående. Man måler derefter lyssignalet, der stammer
5 fra de således behandlede prøver ved hjælp af apparaturer der passer til hvert tilfælde: henholdsvis transmissionfotometer eller reflektionsfotometer eller fluorimeter. Når den faste bærer er en mikrotitreringsplade, kan aflæsningen af de lysende signaler udføres i rækkefølge i alle fordybningerne i
10 samme plade ved anvendelse af automatiserede aflæsere af sædvanlig type i biologilaboratorier f.eks. pladeaflæseren Titer-tek eller pladeaflæseren Fluoroscan til henholdsvis spektrofotometriske aflæsninger eller fluorometriske aflæsninger.

15 Ved anvendelse som enzymatisk sonde af alkalisk phosphatase bevirkes koblingen af dette enzym med det monoklonale antistof efter fremgangsmåden foreslået af Boehringer Mannheim - Biochemica. De foretrukne substrater for dette enzym er paranitrophenylphosphat til en endelig spektrofotometrisk aflæsning
20 eller 4-methylumbelliferylphosphat til en fluorimetrisk aflæsning eller 5-brom-4-chlor-3-indolylphosphat for at få et uopløseligt farvet reaktionsprodukt. Man kan ligeledes som enzymatisk sonde anvende β -galaktosidase, hvis foretrukne substrater så er orthonitrophenyl- β -D-galaktopyranosid eller 4-methylumbelliferyl- β -D-galaktopyranosid.
25

Fortrinsvis kan man koble de monoklonale antistoffer til peroxidasen. I dette tilfælde er koblingsprocessen afledt af den, der er beskrevet af M.B. WILSON og P.K. NAKANE i Immunofluorescence and Related Staining Techniques. W. Knapp, K. Kolubar, G. Wicks udgivere Elsevier/North Holland, Amsterdam,
30 1978, side 215-224. Modifikationerne der er indført i forhold til den første fremstillingsprotokol for enzymatisk konjugering har relation til følgende punkter:

35

det molære forhold peroxydase/antistof er lig med 3 til forskel fra 2 i protokollen,

en mindre fremskreden oxidation af peroxydasens gluciddiele ved en 33% formindskelse af den foreslåede koncentration af natriumperjodat.

- 5 Reagenserne, der anvendes til afsløre peroxydase konjugeret med monoklonalt antistof, omfatter oxygenet vand, enzymsubstrat og en passende chromogen, f.eks. ortho-phenylendiamin eller 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-6-benzothiazolinsulfonsyre) eller ABTS for at få et farvet slutreaktionsprodukt, der er
10 opløseligt i mediet eller 3,3'-diaminobenzidin eller 1'-amino-3-ethyl-9-carbazol eller 4-chlor- α -naphthol for at få et endeligt uopløseligt reaktionsprodukt eller parahydroxyphenylpropionsyre for at få et fluorescerende reaktionsprodukt, der er opløseligt i mediet.

15

I en foretrukken udførelsesform omfatter udstyret ifølge opfindelsen til bestemmelse af antigener karakteristiske for T-lymfocytter, T4-lymfocytter og T8-lymfocytter:

- 20 a) en mikrotitreringsplade i hvis fordybninger, der er fikseret et eller flere monoklonale antistoffer, antilymfocytter T.

b1) En opløsning indeholdende mindst ét monoklonalt antistof antilymfocytter T mærket med peroxydase.

25

b2) En opløsning indeholdende mindst ét monoklonalt antistof anti-antigen CD4 mærket med peroxydase.

- 30 b3) En opløsning indeholdende mindst ét monoklonalt antistof anti-antigen CD8 mærket med peroxydase.

c1) En opløsning indeholdende oxygenet vand, enzymsubstrat i en passende stødpude.

- 35 c2) En opløsning indeholdende chromogenet, der anvendes til at afsløre ekspressionen af enzymets aktivitet.

En anden foretrukken udførelsesform ifølge opfindelsen er anvendelse af monoklonale antistoffer koblet med acetylcholin-

esterase.

Acetylcholinesterase kobles til antistoffet ved fortrinsvis at anvende en fremgangsmåde afledt af den, der er beskrevet i fransk patent nr. 2.550.799, hvor man går frem skematisk som ved fremstilling af fragmenter af antistoffet ved en kendt teknik, modificering af enzymet ved reaktion med et passende heterobifunktionelt middel og til slut kobling af de således fremstillede produkter. Andre kendte fremgangsmåder til konstruktion af immunoenzymatiske konjugater kan ligeledes anvendes i dette tilfælde.

Afsløringen af den enzymatiske aktivitet, der er specifikt bundet til celleantigenet, genkendt af konjugatet med acetylcholinesterase, udføres fortrinsvis ved den velkendte teknik, der anvender acetylthiocholin som enzymsubstrat og Ellmans reagens eller 5,5'-dithio-2-nitrobenzoesyre som chromogen efter enhver variant, der er egnet til det pågældende tilfælde, f.eks. den der er beskrevet Pradelles med flere, Anal. Chem., 57, (1985) 1170-1173.

De nævnte chromogener anvendes som de er eller i form af salte, der er opløselige i vand.

Bestemmelsesresultaterne af antigener ifølge opfindelsen kan udtrykkes på enhver måde, der passer til den udførte undersøgelse. Specielt kan man udtrykke resultaterne enten i totalt antal molekyler af et givet antigen (f.eks. antigen CD4), der findes i et givet rumfang undersøgt prøve (f.eks. i mikroliter blod), eller ved forholdet mellem antal molekyler af et antigen og antallet af molekyler af et andet antigen i den undersøgte prøve (f.eks. forholdet mellem antigenerne CD4 og antigenerne CD8 eller forholdet CD4/CD8 i den undersøgte blodprøve.

35

For at bestemme antallet af molekyler af et givet antigen i den undersøgte prøve anvendes med fortrinsvis en kalibreret skala, der udgøres af celler eller cellepræparater, som bærer

antigenet der skal bestemmes, og som er kalibreret forud ved en kendt referencemetode. Disse standarder udgøres fortrinsvis enten af celler, som er identiske med hensyn til oprindelse med de celler, som er genstand for bestemmelse eller af celler
5 fra etablerede cellelinier, som bærer det eftersøgte antigen eller af præparater f.eks. af membraner, som stammer fra cellerne.

Disse standarder behandles så nøjagtigt som prøverne, der skal
10 undersøges. Signalerne, der fremkommer, tjener til at konstruere en kalibreringsskala, hvormed sammenlignes de signaler, der måles med prøverne, der skal undersøges. De endelige beregninger er klassiske.

15 For at bestemme forholdet mellem antallet af molekyler af to antigener i prøven, der skal undersøges, kan man anvende det ovenfor beskrevne kalibreringssystem og til slut beregne det eftersøgte forhold. Mere enkelt i talrige tilfælde kan man direkte beregne forholdet mellem specifikke signaler fremkommet
20 med hver af de eftersøgte antigener, i givet fald korrigeret det med kendte faktorer, såsom forholdet mellem dimensionerne af de udtagne prøver, der er taget i brug, og man får direkte det søgte forhold.

25 Den immunometriske bestemmelsesmetode ifølge opfindelsen er enkel, hurtig og reproducerbar. Anvendelsen af den er helt egnet til analyse af et stort antal prøver. For at forstå fordelene i sammenligning med andre beskrevne fremgangsmåder, er det hensigtsmæssigt at analysere de forskellige trin.

30

Immobiliseringen af cellerne på den faste bærer er den bestemmelsesfase, som traditionelt frembyder de fleste vanskeligheder, eller som er mest kritisk at udføre. Det middel, der ofte anvendes, er kemisk fiksering af cellerne med glutaraldehyd
35 eller methanol i skåle, der er behandlet eller ikke behandlet med poly-L-lysin (VAN LEUVEN med flere, J. Immunol. Methods, 1978, 23, 109). Alligevel kan de således udførte kemiske fikseringer formindske eller endog undertrykke den eftersøgte

specifikke påvisning eller tværtimod inducere falske positive markeringer af celler, hvilket er en meget alvorlig ulempe (DROVER og MARSHALL, J. Immunol. Methods, 1986, 90, 275-281).

- 5 Udførelsen af fremgangsmåden ved kemisk fiksering nødvendiggør endvidere flere trin: centrifugering af cellerne, fremstilling af blandingen af fikseringsmiddel, fiksering og derefter vask af de fikserede celler.
- 10 Tørring af cellerne ved 37°C eventuelt efterfulgt af en fiksering med methanol i mikrofordybninger har ligeledes været foreslået (BAUMGARTEN, J. Immunol. Methods, 1986, 94, 91-98). Dehydratiseringen af cellerne ved 37°C foruden at den kan ændre visse skrøbelige antigener, permeabiliserer plasmamembranen omkring cellerne, hvilket letter immunomarkering af intracytoplasmiske antigener mere end mærkning af overfladeantigener og fører således til egenstøj, der er generende, eller falske positive resultater, når man ønsker en måling, der er begrænset til overfladeantigener.
- 15
- 20 Endvidere er reproducerbarheden af denne fremgangsmåde usikker. Dekanteringen af cellerne i mikrofordybningerne til bestemmelse og udtørring af cellerne kan variere fra et forsøg til et andet. Desuden er denne bestemmelse langvarig at udføre for tørringstrinnet for cellerne kræver i sig selv en tid på mere end 2 timer.

Immobiliseringen af lymfocytpopulationer har ligeledes været opnået ved hjælp af anvendelse af polyklonale antistoffer adsorberet i mikrofordybninger (STOCKER og HEUSSER, J. Immunol. Methods, 1979, 26, 87-95). Udover at tillade immobilisering af celler, der er fremmede for den eneste population, som man ønsker at analysere, frembyder de polyklonale antistoffer også den ulempe, at reagere med antigenerne der er bestemt til at skulle måles med mærket antistof, hvilket lige så meget reducerer det endeligt målte signal.

30

35

Anvendelse af højt specifikke og beslægtede monoklonale antistoffer adsorberet eller fikseret på den faste bærer og især i

bestemmelsesfordybninger muliggør eksklusiv indfangning af de efterstræbte celler, idet de andre ikke tilbageholdte cellepopulationer fjernes under vaskninger, der udføres for at mærke antigenerne som skal bestemmes. Desuden modificerer intet kemisk eller fysisk middel de karakteristiske egenskaber ved antigenerne på dette trin, for de forskellige operationer, der er beregnet til kemisk eller fysisk at fiksere cellerne til bæreren, er afskaffet.

10 Ifølge den foreliggende opfindelse har det således vist sig, at immobiliseringen af cellerne med monoklonale antistoffer er en fremgangsmåde, som gør det muligt at forenkle immobiliseringstrinnet af cellerne som bærer antigenet, der skal bestemmes, samtidig med at resultaterne gøres mere pålidelige.

15

De immunometriske bestemmelser anvendt på cellepopulationer udføres generelt ved mærkning af cellerne ved en indirekte metode i 2 eller 3 på hinanden følgende trin, idet sonden som bærer det specifikke signal fikseres på cellerne under det sidste trin i mærkningsprocessen. Ved mærkningen af cellerne i to trin benytter de anvendte hovedreagenser antistof anti-immunoglobuliner (anti-Ig) koblet til β -galaktosidase (COBBOLD med flere, J. Immunol. Methods, 1971, 44, 125-133) eller alkalisk phosphatase (HESSIAN, J. Immunol. Methods, 1986, 91, 29-34) eller mærket med jod 125 (SAVION J. Immunol. Methods, 1987, 97, 49-56). Markeringsteknikken med reagenset peroxydase anti-peroxydase udføres i 3 trin (VAN LEUVEN 1978).

En anden fremgangsmåde ligeledes i 3 trin benytter et monoklonalt antistof specifikt for den antigene markør, der skal analyseres og derefter antistof anti-Ig fra mus som bærer biotin og til sidst et konjugat streptavidin-peroxydase (BAUMGARTEN 1986) eller streptavidin-alkalisk phosphatase (IGIETSEME med flere, J. Immunol. Methods, 1987, 97, 123-131).

35

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter samtidig anvendelse i et enkelt trin af en immunoindfangningsproces af hele celler uden fysisk eller kemisk indgreb i cellerne og mærkning

af alle eller en del af cellerne med et eller flere monoklonale antistoffer, som direkte bærer en radioisotopsonde eller enzymatisk sonde, hvilket for første gang muliggør kvantitativ bestemmelse på cellerne selv af valgte membranantigener.

5

Ifølge opfindelsen muliggør den direkte mærkning af immunologisk immobiliserede celler:

forenkling af bestemmelsesmetoden ved afskaffelse af mellem-
10 liggende gentagne manipulationer mellem de på hinanden følgende trin i mærkningen, hvor det drejer sig om indirekte mærkning: centrifugeringer af cellerne, fjernelse af mærkningsreagenser, genoptagelse i suspension,

15 en økonomi med reagenser,

en forbedret pålidelighed ved formindskning af antallet af trin og manipulationer,

20 en tidsgevinst,

mulighed for samtidig at behandle et stort antal prøver udelukkende under anvendelse af sædvanlige materialer og apparater.

25

Inkubationsperioden til immobilisering af cellepopulationen og samtidig direkte mærkning af antigenerne i celleunderpopulationen, som skal bestemmes, er kort. Den er mindre end eller lig med 1 time, hvor det drejer sig om bestemmelse af T-lymfocytter og underpopulationer af T4- og T8-lymfocytter.
30

Efter vask af den faste bærer udføres den egentlige bestemmelse ved iagttagelse af et signal, der er nøjagtigt og enkelt at måle med sædvanligt apparatur: radioaktivitet, absorption
35 eller emission af lys.

Hele fremgangsmåden ifølge opfindelsen frembyder således talrige fordele: den er hurtig, pålidelig, økonomisk og enkel.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen gør det muligt at bestemme overfladeantigener i en cellepopulation inden for en stor række cellekoncentrationer.

5 Metodens følsomhed vis-à-vis antallet af celler afhænger af antigen-tætheden af den bestemte cellepopulation. For hvert antigen kan man, hvis det ønskes, definere den minimale molære koncentration af antigen, som kan måles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

10

Når f.eks. den valgte, faste bærer er en mikrotitreringsplade, og når de undersøgte celler er humane lymfocytter, har man således iagttaget, at man får signifikante målinger, når antallet af analyserede celler er mellem nogle hundrede og ca. 15 200.000 pr. mikrofordybning på 200 μ l, idet den nedre grænse er bestemt af den målte tæthed af antigen på de undersøgte celler og følsomheden af den valgte påvisningsteknik, medens den øvre grænse i det væsentlige afhænger af dimensionen og geometrien af den faste bærer. Det er det samme, når den faste 20 bærer udgøres af reagensglas.

Man har bekræftet, at de registrerede signaler (tælling af radioaktivitet eller fotometriske målinger) gør det muligt, at få kalibreringskurver der er regelmæssige og tilfredsstillende som funktion af det antal celler, der er anvendt under de 25 sædvanlige manipuleringsbetingelser.

I øvrigt kan man forbedre følsomheden af fremgangsmåden, hvis det er nødvendigt, ved samtidigt at fiksure på samme overfladeantigen flere forskellige monoklonale antistoffer, der er 30 specifikke for flere forskellige epitoper af samme antigen. Dette er blevet bekræftet ved bestemmelse af CD4-antigener på celler af linien Ichikawa (human T-linie), hvortil man samtidig har anvendt antistofferne OKT4 og ST4 mærket med jod 125. 35 Det målte signal er forøget ca. 50% i forhold til de signaler, der opnås med hver af antistofferne anti-CD4 anvendt alene.

I de følgende eksempler anvendes uden forskel følgende udtryk eller deres forkortelser:

BSA	:	okseserumalbumin
PBS	:	salthodig fosphatstødpude med pH 7,4
POD	:	peroxydase
5 IgG	:	immunoglobulin G
IgM	:	immunoglobulin M
IgG anti-T eller anti-T	:	antistof anti-lymfocyt T
IgG anti-CD4 eller anti-CD4	:	antistof anti-antigen CD4
IgG anti-CD8 eller anti-CD8	:	antistof anti-antigen CD8
10 cpm	:	slag pr. minut
dpm	:	desintegrationer pr. minut.

Eksempel 1

15 Immunoenzymometrisk bestemmelse af den molekylære koncentration af antigenerne CD4 og CD8 ud fra humane blodprøver omfattende en mærkning af antistoffer med peroxydase.

A) Fremstilling af bestemmelsesudstyret.

20

a) Fremstilling af pladen.

Man anvender en mikrotitreringsplade af plast forhandlet af NUNC (reference 64393) med 96 mikrofordybninger. Man anbringer i hver mikrofordybning 200 μ l af en opløsning indeholdende det rensede monoclonale antistof anti-CD2 (kaldet ST11), der anvendes til at immobilisere totale T-lymfocytter, dvs. for at bevirke deres immunoindfangning. Dette antistof, der forhandles af BIOSYS, Compiègne, Frankrig under referencen ST11 anvendes i en koncentration på 10 μ g/ml i en saltholdig fosphatstødpude med pH værdi 7,4 (PBS). Adsorptionen af det monoclonale antistof sker ved 4°C i 12 timer. Man fjerner overskud af antistof ved omvending af pladen.

35 Man fremstiller en opløsning indeholdende 0,1% gelatine og 0,5% BSA i en saltholdig fosphatstødpude. Man indfører 250 μ l af denne opløsning pr. mikrofordybning for at mætte overfladerne af fordybningerne med protein, hvilket opnås efter 1

time ved 37°C. Man vasker pladerne 3 gange med saltholdig phosphatstødpude. De således fremstillede plader lyofiliseres og lagres ved 4°C i en forseglet plastpose.

- 5 b) Fremstilling af opløsningen af konjugat af monoklonalt antistof og peroxydase.

Man anvender peroxydase (POD) forhandlet af Boehringer Mannheim Biochemica (reference 814 393).

10

Koblingsprocessen mellem antistoffet og peroxydasen er den, der er beskrevet af M.B. WILSON og P.K. NAKANE i Immunofluorescence and Related Techniques (W. KNAPP, K. KOLUBAR, G. WICK udgivere 1978, Elsevier/North Holland, Amsterdam, side 215-
15 224) med undtagelse af, at man til oxidationen af peroxydasen benytter 1,5 mg POD i 0,36 ml destilleret vand, og at man tilføjer 50 µl af en 0,2 M opløsning af natriumperjodat. Det således fremkomne produkt kobles med 2 mg IgG anti-CD4 indeholdt i 50 µl carbonatstødpude. Efter behandling med natriumborhydrid og dialyse over for PBS steriliseres konjugatet IgG-POD
20 ved filtrering på membran 0,22 µm og opbevares under sterile betingelser i en koncentration på 0,5 mg IgG pr. ml ved 4°C i reagensglas. Reagenset er stabilt i mindst 1 år.

- 25 På samme måde fremstilles konjugatet IgG-anti CD8-POD. På samme måde kan man fremstille konjugatet IgM-POD.

c) Fremstilling af afsløringsreagenset.

30 Afsløringsreagenset fås på følgende måde: man fremstiller en 0,1 M citratstødpude ved at opløse citronsyremonohydrat i en mængde af 2,1% i vand og indstille til en pH-værdi på 5 ved tilsætning af 7N natriumhydroxid. Man tilsætter så 30 mg orthophenylendiamindichlorhydrat til 20 ml citratstødpude og
35 derefter tilsættes i sidste øjeblik 40 µl 30% oxygeneret vand (enzymsubstrat) til 20 ml citratstødpude indeholdende orthophenylendiamin.

B) Immunometrisk fremgangsmåde.

a) Fraskillelse af celler.

5 Man udtager 2 ml blodprøve, der skal bestemmes. Man blander dem med 2 ml saltholdig fosfatstødpude og anbringer denne blanding oven på 3 ml FICOLL-PAQUE (forhandlet af Pharmacia). Ved centrifugering ved 400 x g i 30 minutter ved omgivelsernes temperatur dannes en ring af suspension indeholdende de
10 enkernede celler. Man genvinder hele denne suspension i et rumfang på 1 ml, og man fordeler 6 x 100 µl af den fremkomne suspension i 6 mikroforybninger på den tidligere fremstillede plade.

15 b) Inkubation af cellerne.

Man fortynder til en hundrededel det tidligere fremstillede konjugat POD-antistof ved hjælp af PBS indeholdende 1% proteinstof, såsom BSA eller skummetmælkspulver, og man anbringer
20 100 µl af denne opløsning pr. mikroforybning nemlig:

2 mikroforybninger fyldes med hver 100 µl af opløsningen af konjugat POD-anti-CD4.

25 2 mikroforybninger fyldes med hver 100 µl af opløsningen af konjugat POD-anti-CD8.

2 mikroforybninger til kontrol fyldes med hver 100 ml opløsning med 1% proteinstof (blindreaktion).

30

For at forbedre fikseringen af cellerne på bæreren centrifugerer man pladen i 3 minutter ved 150 x g efter at have ventet 1 time ved omgivelsernes temperatur.

35 c) Afsløring af fikseret enzym og måling.

Man tømmer mikroforybningerne ved at omvende pladen. Man vasker mikroforybningerne 4 gange med 200 µl PBS. Man sætter

til hver fordybning 200 μ l afsløringsreagens fremstillet umiddelbart til brug. Man lader inkubere i 20 minutter ved omgivelsernes temperatur i dæmpet lys. Man måler den optiske tæthed med spektrofotometer ved 492 nm (apparatet Titertek Multi-
5 skan type 310 C - Flow Laboratories).

d) Kalibrering og udtryk af resultaterne.

For at udføre kalibrering af disse målinger anvendes et præparat af totale humane lymfocytter, der forud er kalibreret
10 med hensyn til CD4 og CD8 antigener ved den cytofluorimetrisk teknik ifølge PONCELET med flere (J. Immunol. Methods, 1985, 85, 65-74). Udtagning af lige store kendte portioner af dette sammenligningspræparat tjener til at udgøre de to kalibreringsskalaer for henholdsvis antigen CD4 og antigen CD8 i forhold
15 til hvilke, der beregnes antallet af antigener svarende til hver prøve.

Som eksempel viser følgende tabel 1 for 20 humane blodprøver
20 stammende fra raske donorer værdierne af de opnåede optiske tætheder, antallet af molekyler antigen CD4 og CD8 og de heraf følgende forhold mellem antal af antigener (forholdet CD4/CD8).

25

30

35

Tabel 1

5	Donor nr	Antigen CD4		Antigen CD8		Mol- for- hold CD4/ CD8
		Optisk tæthed	Antal antigen- molekyler (i millioner) pr. μ l blod	Optisk tæthed	Antal antigen- molekyler (i millioner) pr. μ l blod	
	1	0,64	23	1,29	92	0,25
	2	0,71	27	0,75	37	0,73
	3	0,82	32	1,10	81	0,39
	4	0,49	17	0,55	23	0,74
	5	0,74	29	0,89	52	0,56
10	6	0,88	38	0,92	55	0,69
	7	0,74	29	0,72	36	0,80
	8	0,75	29	0,69	33	0,88
	9	0,48	16	0,80	41	0,39
	10	1,00	50	1,08	80	0,62
	11	0,61	22	0,69	33	0,67
	12	0,73	28	0,85	46	0,61
	13	0,51	18	0,66	30	0,60
15	14	0,65	24	1,06	76	0,31
	15	0,92	42	0,87	48	0,87
	16	0,77	31	0,98	63	0,49
	17	0,68	25	1,01	67	0,37
	18	0,85	36	0,96	61	0,59
	19	0,91	41	0,90	52	0,79
	20	1,00	50	1,02	69	0,72

20

Eksempel 2

Immunoenzymetrisk bestemmelse af den molekulære koncentration af antigenerne CD4 og CD8 i prøver af menneskeblod omfattende en mærkning af antistof med alkalisk fosfatase.

Denne bestemmelse udføres som den i eksempel 1. Fremstillingen af konjugatet af monoklonalt antistof og alkalisk fosfatase udføres ved fremgangsmåden angivet af Boehringer Mannheim - Biochemica (reference 567 744). Efter 1 times inkubation af cellerne, som skal bestemmes med dette konjugat, afslører man fikseret enzym ved tilsætning af en opløsning af paranitrophenylphosphat 1 mg/ml i en 1,2% diethanolaminstødpude i destilleret vand indstillet til pH 9,8 med en fortyndet opløsning af saltsyre. Efter 2 timer ved 37°C måles den optiske tæthed med spektrofotometer ved 405 nm.

35

Resultaterne beregnes og udtrykkes som i eksempel 1.

Eksempel 3

Immunoradiometrisk bestemmelse af den molekylære koncentration af antigenerne CD4 og CD8 i prøver af menneskeblod omfattende en mærkning af antistof med jod 125.

Fremstillingen af antistof mærket med jod 125 udføres ved teknikken beskrevet af F.C. GREENWOOD, V.M. HUNTER med flere, Biochem. J., 1963, 89, 114.

10

Man blander 50 μ g monoklonalt antistof anti-CD4 eller anti-CD8 indeholdt i 50 μ l saltholdig fosfatstødpude med pH 7,2 med 37 MBq jod 125 i form af natriumjodid og 30 μ l af en opløsning af chloramin T i en saltholdig fosfatstødpude indeholdende 0,33 mg chloramin T pr. ml. Efter 1 time under omrøring standser man mærkningsreaktionen af det monoklonale antistof ved at tilsætte 100 μ l af en opløsning af natriummethabisulfit med 2,5 mg/ml. Den således fremstillede opløsning føres på en PD 10 søjle (Pharmacia - Sephadex G25M), og man udvinder i afløbet den fraktion, der indeholder det radiomærkede antistof. Bestemmelsen udføres ved i 4 mikrofordybninger at indføre et rumfang på 100 μ l cellesuspension indeholdende de enkernede celler af menneskeblod fremstillet som i eksempel 1. Man anbringer derefter 100 μ l fortyndet opløsning af radioaktivt antistof i en stødpude PBS indeholdende 5% BSA, således at der indføres 150.000 cpm pr. fordybning. 2 mikrofordybninger fyldes med hver 100 μ l af opløsningen af konjugat anti-CD4-125-I, 2 mikrofordybninger fyldes med hver 100 μ l af opløsningen af konjugatet anti-CD8-125-I. Fikseringen af cellerne forbedres ved centrifugering af pladen i 3 minutter ved 150 x g efter 1 times inkubation ved omgivelsernes temperatur. Mikrofordybningerne tømmes ved at omvende pladen. Man vasker mikrofordybningerne 4 gange med 200 μ l PBS pr. fordybning. Man indfører derpå 75 μ l 1 M natriumhydroxidopløsning i hver fordybning. Efter 10 minutter genvindes indholdet af hver fordybning med en absorberende stødpude, før tælling af radioaktiviteten med en γ -tæller (multitæller LKB).

Resultaterne beregnes og udtrykkes som i eksempel 1, idet værdierne for optisk tæthed erstattes med resultaterne af tælling i dpm.

5 Eksempel 4

Bekræftelse af gyldigheden af metoden.

På 20 udtagne prøver af menneskeblod måler man antigenerne
10 CD4 og CD8 på humane T-celler ved at følge den immunometriske metode med peroxydase, der er beskrevet i eksempel 1. På samme blodprøver bestemmes desuden ved anvendelse af sædvanlig teknik (W.W. ERBER med flere, Lancet, 1984, (8385), 1042-1045) til cytologisk tælling forholdet mellem antallet af positive
15 T4-celler og antallet af positive T8-celler.

Korrelationskoefficienten mellem forholdet CD4/CD8 fremkommet ved immunoenzymometrisk bestemmelse og forholdet T4/T8 fremkommet ved cytologisk tælling er $r=0,72$.

20

På 7 andre udtagninger af menneskeblod sammenligner man ligeledes forholdet CD4/CD8 bestemt ved den immunoradiometriske metode under anvendelse af mærkning med jod 125 ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse og forholdet mellem
25 cellerne T4/T8 bestemt ved tælling af cellerne. Korrelationskoefficienten er $r=0,87$.

I de 2 tilfælde viser de opnåede korrelationskoefficienter, at trods en samlet tilfredsstillende overensstemmelse mellem
30 sultaterne af de 2 teknikker er informationen, som de 2 forhold giver, ikke ækvivalente, hvilket er klart, da bestemmelsen af antigenerne ifølge opfindelsen tager hensyn til ikke blot antallet af positive celler, som det er tilfældet ved den cytologiske metode, men også til tætheden af det pågældende
35 antigen på de positive celler af hver prøve. Den information, som gives ved teknikken beskrevet i den foreliggende opfindelse, er derfor mere fuldstændig end den, der gives ved den sædvanlige sammenligningsteknik (W.W. ERBER med flere, Lancet, 1984, (8385), 1042-1045).

Eksempel 5

Immunoenzymometrisk bestemmelse af den molekylære koncentration af antigenerne CD4 og CD8 på T-lymfocytter i prøver af menneskeblod omfattende en markering af antistof med peroxidase.

Dette eksempel er beregnet til at vise, at man kan formindske den nødvendige varighed af bestemmelsen i forhold til de i eksempel 1 beskrevne betingelser ved at modificere dels fremgangsmåden til fraskillelse af cellerne og dels inkubationstiden, som er nødvendig i trinnet til immunoindfangning og mærkning af cellerne.

A) Indflydelse af fremgangsmåde til adskillelse af celler fra totalblod.

a) Teknik ved kortvarig centrifugering:

Man udtager 0,5 ml blodprøve, som skal bestemmes, som man blander med 1,5 ml saltholdig phosphatstødpude. I et 5 ml hæmolyseglas indføres 1,5 ml Ficoll-Paque, forhandlet af Pharmacia, og på overfladen af laget af Ficoll anbringes blodprøven fortyndet i PBS. Efter 5 minutters centrifugering ved 900 x g ved omgivelsernes temperatur udtager man ringen af suspension indeholdende de enkernede celler i et rumfang på 0,5 ml. Denne prøve sættes til 1,5 ml PBS.

b) Teknik ved lyse af erythrocytter:

30

En anden hurtig metode til adskillelse af blodceller er anvendelse af en stødpude, som lyser de røde blodlegemer. Lysestødpuden, der anvendes som ikke-begrænsende eksempel, har følgende sammensætning:

35

ammoniumchlorid: 8,29 g
surt kaliumcarbonat: 1 g
dinatriumsalt af ethylendiamintetraeddikesyre: 0,0307 g til 1 l destilleret vand, hvis pH er indstillet til 7,3.

Man blander 5 ml lysestødpude og 0,250 ml blod. Efter 10 minutter under omrøring centrifugerer man ved 600 x g i 10 minutter. Det dannede bundfald af celler optages i 1 ml stødpude PBS.

5

Ved derefter at udføre bestemmelsen af antigenerne CD4 og CD8 under betingelserne i eksempel 1 og ved sammenligning med referenceprotokollen beskrevet i eksempel 1 til isolering af enkernede blodceller har man bekræftet, at den ene og den anden af disse 2 varianter af fremgangsmåden til adskillelse af enkernede celler fra totalt blod har muliggjort opsamling af alle lymfocytterne i de undersøgte blodprøver.

15 B) Indflydelse af inkubationstid på immunoindfangning og mærkning af cellerne.

For at bekræfte om den tid på 1 time, der anvendes i eksempel 1, ikke kan reduceres for at fremskynde forløbet af bestemmelsen, har man sammenlignet resultaterne opnåede for identiske prøver indeholdende hver 20.000 enkernede celler pr. fordybning, når man lader tiden i trinnet til indfangning og mærkning af cellerne variere fra 10 minutter til 1 time. Arbejdsbetingelser er i øvrigt som i eksempel 1, og de fremkomne resultater er vist i tabel 2.

25

Tabel 2

30	Inkubations- tid (min).	Optisk tæthed			
		Antigen CD4		Antigen CD8	
		Prøve	Blindprøve*	Prøve	Blindprøve*
	10	0,322	0,037	0,329	0,023
	20	0,438	0,049	0,401	0,025
	30	0,620	0,055	0,498	0,027

35

* Disse værdier for optisk tæthed svarer til blindforsøg udført i fravær af celler. Kontrolværdierne opnået i nærværelse af celler og under udeladelse af enten konjugatet eller substratet er ikke bedre end de viste værdier.

Disse resultater viser at:

det uspecifikke signal (blindprøve) bliver på værdier, der altid er lave, og som er lavere jo kortere tiden for tilstedeværelse af konjugat er.

Det specifikke signal opnår efter 10 minutters kontakt en værdi, der kan udnyttes analytisk med nøjagtighed og reproducerbarhed. Dette viser, at det er muligt i forhold til betingelserne i eksempel 1 betydeligt at reducere varigheden af udførelsen af bestemmelsen uden betydeligt tab af nøjagtighed i resultaterne.

I praksis, og hvis man samler tidsgevinsten, som man kan opnå ved fremstillingen af blodprøven og ved immunoindfangningen, er det muligt med udstyret og fremgangsmåden ifølge opfindelsen at bestemme antigenerne CD4 og CD8 (som ikke begrænsende eksempler) i prøver af totalt blod i en mængde af 10 eller 20 prøver pr. plade med 96 fordybninger på en samlet tid (efter modtagelsen af prøverne i laboratoriet) som ikke overstiger 1 time. Dette produktivitetsniveau er bedre end af alle til dato kendte alternative teknikker.

Eksempel 6

25

Immunometrisk bestemmelse af den molekulære koncentration af antigenerne CD5 på humane T-lymfocytter i prøver af menneskeblod omfattende mærkning af antistof med acetylcholinesterase.

30 A) Fremstilling af bestemmelsesudstyret.

a) Fast bærer.

Man anvender en mikrotitreringsplade fremstillet på den måde, der er beskrevet i eksempel 1.

b) Konjugat af monklonalt antistof og acetylcholinesterase.

Man anvender acetylcholinesterase fra *Electrophorus electricus* fremstillet ved teknikken beskrevet i fransk patent nr. 2.550.799.

- 5 Dette enzym kobles med antistoffet anti-CD5 kaldet ST1 og forhandlet af BIOSYS. Koblingen udføres ved fremgangsmåden beskrevet af YOSHITAKE med flere, *Eru. J. Biochem.*, 101 (1979), 395-399.

10 c) Afsløringsreagens.

Dette reagens omfatter både enzymsubstratet (acetylthiocholin) og Ellman's reagens og har følgende sammensætning:

- 15 Acetylthiocholin $7,5 \times 10^{-4}M$
5,5'-dithio-2-nitro-benzoesyre (DTNB) $5 \times 10^{-4}M$
i en natriumphosphatstødpude 1M pH 7,4.

Denne opløsning fortyndes til 1/100e i destilleret vand før
20 brugen.

B) Immunometrisk fremgangsmåde.

a) De enkernede celler fraskilles ved anvendelse af metoden
25 beskrevet i eksempel 1.

b) Inkubationen af cellerne i immunoindfangnings- og mærke-
ringstrinnet varer 20 minutter som i eksempel 5.

30 c) Afsløring af fikseret enzym og måling.

Man sætter 100 μ l afsløringsreagens til hver mikroforydning.
Absorbansen måles ved 412 nm efter 45 minutters inkubation.

35 De optiske tætheder, der er målt for prøver indeholdende kendte antal T-celler, er vist i tabel 3. Under disse forsøgsbetingelser er blindprøven særlig svag og svarer til en optisk tæthed på 0,002 til 0,003.

Tabel 3

		Antal T-lymfocytter indført pr. fordybning og					
5		antal molekyler antigen CD5 tilstede pr. for-					
		dybning i millioner					
		540	1.080	2.160	4.320	8.640	17.280
		(32)	(65)	(130)	(260)	(520)	(1.040)
	Optisk						
10	tæthed	0,030	0,060	0,138	0,260	0,470	0,850

Disse resultater belyser den store følsomhed af den således udarbejdede teknik. Den optiske tæthed på 0,030 fremkommet i 15 fordybninger indeholdende 540 T-lymfocytter (dvs. 32 millioner molekyler antigen CD5) som kan måles med nøjagtighed og er lig med 10 gange baggrundsstøjen svarer til ca. 5×10^{-17} mol antigen CD5 pr. fordybning. En sådan følsomhed er af samme størrelsesorden som de bedste kendte immunbestemmelser, som be- 20 nytter de mest følsomme radioaktive sporstoffer.

Eskempel 7

Bestemmelse af forskellige antigener udtrykt på aktiverede 25 humane T-lymfocytter.

Aktivering af T-lymfocytter er en fysiologisk proces, som griber for tidligt ind, hver gang immunsystemet stimuleres som f.eks. ved infektionspatologier, ved transplantation af organer, og ved visse sygdomme med svigtende immunsystem. Denne 30 naturlige proces bevirkes også almindeligt in vitro i laboratoriet i prøver, såsom især blandede lymfocytreaktioner eller prøver af lymfoblastisk omdannelse. I sidstnævnte tilfælde opnås den polyklonale aktivering ved anvendelse af midler såsom 35 phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A eller andre lectiner. Aktiveringen af T-lymfocytter ledsages af en betydelig vækst i udtrykket af flere membranmarkører og især antigenet CD25 (receptor for interleukin 2) eller antigenet CD2. Disse antigener

udgør derfor udmærkede markører for aktiveringstilstanden og bestemmelse af dem har stor interesse både i klinisk biologi og til de ovenfor nævnte laboratoriearbejder under undgåelse i alle tilfælde af anvendelse af radioaktive reagenser.

5

Disse antigener måles ved at anvende den metode, der er beskrevet i eksempel 1, med de specifikationer der er præciseret i tabel 4.

10

Tabel 4

Måling af overfladeantigen på aktiverede T-lymfocytter			
Målt antigen	Antistof anvendt til immunoindfangning	Antistof mærket med peroxydase	Antistof mærket med
	forhandlet af	forhandlet af	
CD2	ST 1 BIOSYS	ST 11 BIOSYS	
CD25	ST 11 BIOSYS	IOT 14 IMMUNTECH	

20 Værdierne for optisk tæthed målt ved 450 nm for de anvendte 25×10^3 enkernede celler er vist i nedenstående tabel 5 og sammenligner de samme celler uden stimulering med PHA og efter 3 dages stimulering.

25

Tabel 5

Optiske tætheder			
Antigen	Ikke-aktiverede celler	Celler aktiveret i 3 dage	Blind-prøve
CD25	0,064	0,529	0,044
CD2	0,129	0,768	0,027

35 Disse resultater viser en betydelige vækst i de specifikke signaler af de 2 undersøgte antigener, når der sker aktivering.

Eksempel 8

Bestemmelse af antigenerne CD22 og HLA-Dr (eller HLA af klasse II) der findes på B-lymfocytter.

5

Dette eksempel beskriver bestemmelsen af disse antigener på celler af linien RAJ I, som er en human B-lymfoid linie, beskrevet af PULVERTAFT i J. Clin. Pathol., 1965, 18, 261-274.

10 Til immunoindfangning af cellerne har man i bestemmelsesfordybninger adsorberet som vist i eksempel 1 enten antistof S-klasse II (BIOSYS) til bestemmelse af antigenerne CD22 eller antistof SB4 (BIOSYS) til bestemmelse af antigenerne HLA af klasse II (eller HLA-Dr).

15

a) Bestemmelse af antigen CD22:

Antistof SB22 (BIOSYS) er blevet mærket med jod 125 med metoden beskrevet i eksempel 3. Bestemmelsen af antigen CD22 udføres på den måde, der er vist i eksempel 3 for antigenerne CD4 og CD8 ved i mikrofordybningerne at indføre i rækkefølge: 5 x 10⁴ celler af linien RAJI og derefter 10⁵ cpm af mærket antistof SB22. Efter 1 time ved 4°C tømmes mikrofordybningerne ved omvendning af pladen, og vaskes derefter 4 gange med 200 µl PBS pr. fordybning ved hver vask. Radioaktiviteten fikseret på cellerne genvindes og tælles som i eksempel 3. Man får derved en tælling på 760 dpm pr. fordybning indeholdende 5 x 10⁴ celler RAJI med en blindprøve (uden celler) på 50 dpm.

30 b) Bestemmelse af antigen HLA-Dr:

Man indfører i rækkefølge i fordybningerne 10⁵ celler og konjugatet antistof S-klasse II mærket med peroxydase på den måde, der er beskrevet i eksempel 1. Bestemmelsen udføres efter samme protokol som i eksempel 1. Man får derved en optisk tæthed på 1,840 og en blindprøve uden celler på 0,105.

35

Eksempel 9

Anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen til måling af antigener båret af T-lymfocytter og B-lymfocytter fra menneskeblod.

A) Fremstilling af plader:

Man anvender mikrotitreringsplader fremstillede som i eksempel 1 med undtagelse af at i hver fordybning i mikropladen adsorberes både monoklonale antistoffer, der er i stand til at fikseres mindst alle T-lymfocytter (S-klasse I fra BIOSYS) og B-lymfocytterne (S-klasse II fra BIOSYS), der hver anvendes i en koncentration på 5 µg/ml.

15

B) Immunometrisk bestemmelse:

De enkernede celler adskilles fra totalt blod ved hjælp af Ficoll under betingelserne i eksempel 1 eller eksempel 5, og derefter indfører man 80.000 enkernede celler pr. fordybning i 75 µl stødpude PBS. T-lymfocytterne måles i visse fordybninger med antistof ST11 (anti-CD2) fra BIOSYS. B-lymfocytterne måles i andre fordybninger med antistof SB3 (anti-CD37) fra BIOSYS, som genkender alle de perifere B-lymfocytter. Disse antistoffer er på forhånd koblet med peroxydase efter protokollen beskrevet i eksempel 1. Den egentlige bestemmelse udføres som i eksempel 1.

25

C) Resultater.

30

Det absolutte antal T-lymfocytter og B-lymfocytter indeholdt i den undersøgte prøve bestemmes, idet der henholdes til kalibreringskurver, etableret ved at behandle identisk enkernede celler, hvori T- og B-lymfocytterne er blevet talt ved en sammenligningsteknik.

35

Ved hjælp af passende standarder kan man alternativt også udtrykke resultaterne i molære koncentrationer af antigener CD2 og CD37 i den undersøgte prøve.

Eksempel 10.

Bestemmelse af antigenerne GpIIb-IIIa og CD9 på humane blodplader.

5

Bestemmelsen udføres ifølge eksempel 3 under anvendelse af monoklonale antistoffer radiomærket med jod 125.

10 Blodpladerne isoleres fra menneskeblod ved centrifugering i nærværelse af perfusionsvæske PLASMION (Laboratoire R. Bellon). Man blander i et reagensglas 5 ml blod + 5 ml saltholdig fosfatstødpude (PBS) og 10 ml PLASMION. Glasset centrifugeres så i 10 minutter ved 1500 o/m. Blodpladerne, der er samlet i den overliggende væske, udtages ved udsugning med
15 pipette. De vaskes en gang i PBS ved blanding af 1 rumfang blodpladesuspension med 10 ml PBS og centrifugeres så i 10 minutter ved 1000 x g. Til slut opsamler man blodpladebundfaldet, som bringes i suspension igen i PBS (2 ml). Blodpladerne tælles, og deres koncentration indstilles til 2,5 millioner pr. ml PBS.
20

For at bestemme antigenet GpIIb-IIIa udfører man immunoindfangning af blodpladerne med det monoklonale antistof IOB2 (Immunotech) og mærkning af antigenet GpII-IIIa med det monoklonale antistof P2 (Immunotech).
25

For at bestemme antigenet CD9 bevirker man immunoindfangning med det monoklonale antistof P2 og mærkning med det monoklonale antistof IOB2. Man måler antallet af dpm pr. prøve omfattende 200.000 blodplader.
30

Resultaterne er vist i tabel 6.

Tabel 6

	Målt antigen	Prøve målt (dpm)	Kontrol uden celler (dpm)
5	CD9	1.927	113
	GpIIb-IIIa	2.891	238

Eksempel 11

10

Bestemmelse af antigener CD15 båret af humane granulocytter.

Antigen CD15 er en god specifik markør for humane granulocytter (også kaldet flerkernede legemer). Bedømmelsen af disse celler i kraft af dette antigen kan praktiseres i blod, som for enhver anden leukocytunderpopulation. Den anvendes ligeledes til at bedømme tilstedeværelsen af granulocytter i urin f.eks. i tilfælde af urinvejsinfektioner, såsom cystitis eller pyelonephritis. I det foreliggende eksempel er bestemmelsen udført på granulocytter, der stammer fra totalt blod og er fraskilt som vist nedenfor.

Granulocytterne bliver samtidig med visse enkernede celler skilt fra røde blodlegemer ved en fremgangsmåde analog med den, der er beskrevet i eksempel 10 for blodplader, med undtagelse af, at man henstiller glasset indeholdende cellerne i 45 minutter ved omgivelsernes temperatur, og man genvinder suspension af leukocytterne i 500 µl udtaget ved overfladen af væsken.

30

Granulocytterne immobiliseres i fordybninger med et monoklonalt antistof, der er specifikt for antigen CD45, som findes på cellemembranen af alle leukocytterne: man anvender antistoffet anti-LCA (BIOSYS) adsorberet i mikrofordybningerne i titreringspladen som vist i eksempel 1.

35

Til bestemmelsen anvender man det monoklonale antistof anti-CD15 SMY-15a (BIOSYS) mærket med peroxydase ved teknikken beskrevet i eksempel 1.

Med 12.500 totale celler indført pr. fordybning er det specifikke signal af antigen CD15 fra granulocytterne således 0,616 efter korrektion af den ubearbejdede optiske tæthed for en blindprøve på 0,100 fremkommet i nærværelse af celler og i fravær af enzymatisk konjugat og for granulocytterens endogene peroxydasevand.

Eksempel 12

10 Bedømmelse af en leukæmis phenotype ved den immunoenzymometriske fremgangsmåde.

Phenotypebestemmelsen af tumorceller hos en leukæmipatient er en systematisk diagnostisk undersøgelse, der udføres for at karakterisere typen og oprindelsen af patientens leukæmiceller (T, B, granulocytter, myeloblaster osv.). Denne undersøgelse udføres traditionelt ved immunofluorescenceteknikken ved at anvende et batteri af monoklonale antistoffer og iagttage og tælle de positive celler i mikroskop. Man anvender ligeledes strømningscytopometri for at analysere mærkningen af cellerne.

Anvendelsen af monoklonale antistoffer ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen gør det muligt at identificere de store klinisk betydningsfulde grupper af akut eller kronisk leukæmi ved desuden at anvende en kvantitativ oplysning om de relative tætheder af de forskellige undersøgte antigener.

I dette eksempel er fremstillet 6 monoklonale antistoffer koblet med peroxydase, der er specifikke for antigener, der findes på leukæmiceller:

ST1 og ST11 (BIOSYS): anti-CD 5 og anti-CD2

SB3 (BIOSYS): anti-CD37

S-CALLA (SANOFI): anti-CALLA (eller anti-CD10)

35 S-klasse II (BIOSYS): anti-HLA-Dr (eller anti-HLA af klasse II)

SMY15 (BIOSYS): anti-CD15.

Mikrotitreringspladen fremstilles ved forudgående adsorption af en blanding af de monoklonale antistoffer anti-CD45 (S-LCA, BIOSYS) og anti-HLA af klasse I (S-klasse I, BIOSYS).

- 5 Ved anvendelse af de ovennævnte 6 udvalgte monoklonale antistoffer har man bedømt phenotypen af en kronisk lymfoid leukæmi B (LLC-B) som i øvrigt blev karakteriseret ved den sædvanlige metode.
- 10 For i alt 80.000 enkernede celler indført pr. fordybning eller for kontrolfordybningerne uden celler er de optiske tætheder målt ved 492 nm anført i nedenstående tabel 7. For kontrolfordybningerne med celler, men uden antistof mærket med peroxydase er den optiske tæthed 0,110.

15

Tabel 7

20	Monoklonalt antistof og tilsvarende antigen	Optisk tæthed	
		Prøve med celler	Kontrol uden celler
	ST11 (CD2)	0,270	0,030
	ST1 (CD5)	1,350	0,014
25	SB3 (CD37)	0,850	0,005
	S-klasse II (HLA-Dr)	1,640	0,010
	SMY15 (CD15)	0,235	0,007
	CALLA (CD10)	0,160	0,002

30

De undersøgte leukæmiceller bærer således rigeligt af antigenerne CD5, CD37 og HLA af klasse II, men de bærer ikke eller kun meget svagt antigenerne CD15, CALLA og CD2, hvilket er karakteristisk for en LLC-B.

35

Eskempel 13

Bestemmelse af antigener, der står i forbindelse med cancer i urinvejene.

5

Udstyret og fremgangsmåderne ifølge opfindelsen er især tilpasset til påvisning af tumorceller, især tumorer i urinvejene, og er velegnede til masseopsporing i højrisikogrupper f.eks. arbejdere i den kemiske industri eller andre meget udsatte grupper.

10

Det foreliggende eksempel viser anvendelsen af opfindelsen til bestemmelse af et antigen, der står i forbindelse med blærekræft, på cellerne af linien RT4, der stammer fra en human urinvejspapillom (C.C. Rigby og L.M. Franks, Brit. J. Cancer, 1970, 24, 746-754).

15

Pladerne beregnet til immunoindfangning af cellerne fremstilles som i eksempel 1 ved i fordybningerne at adsorbere det monoklonale antistof S-klasse I (BIOSYS), som genkender et antigen HLA af klasse I, og er i stand til at fastholde alle epitelcellerne.

20

Markeringskonjugaterne fås ved fremgangsmåderne i eksempel 1 (til enzymatisk markering) eller eksempel 3 (til radioisotopmarkering) med det monoklonale antistof 12F6 (SANOFI) som genkender et antigen, der står i forbindelse med blærekræft.

25

Til bestemmelsen fordeles i 4 mikrofordybninger 75 μ l af celsuspensionen (dvs. 50×10^3 celler pr. fordybning). I 2 fordybninger indføres konjugatet af monoklonalt antistof 12F6 (SANOFI) koblet med peroxydase, i 2 andre fordybninger antistoffet 12F6 mærket med jod 125 (100.000 cpm/fordybning). Resultaterne, der blev opnået ved anvendelse af den immunoenzymometriske fremgangsmåde eller den radioimmunometriske fremgangsmåde, er vist i tabel 8.

35

Tabel 8

	Mærket mono- klonalt anti- stof	Optisk tæthed (ved 492 nm) eller cpm	Prøve der skal bestemmes	Kontrol	Forhold patient sig- nal/uspeci- fikt signal
5					
10	12F6 peroxydase	0,782		0,078	10,0
	12F6 jod 125	1,612		350	4,6

Eksempel 14

Immunoenzymometrisk bestemmelse af et membranantigen på gæren
15 *Candida albicans*.

Cellerne af *Candida albicans* (serotype 17) stammer fra samlin-
gen i Institut Pasteur, Paris. Gæren dyrkes i 18 timer på sæd-
vanlig måde på et fast syntetisk medium. Cellerne tælles, og
20 man fremstiller en celled suspension indeholdende 10^5 celler pr.
ml opløsning i stødpude PBS.

De anvendte monoklonale antistoffer anti-*Candida albicans* er
fremstillet ved lymfocythybridisering, som beskrevet i doktor-
25 afhandlingen af T. Chardes, Faculté de Pharmacie, Universitet
i Montpellier I, 1988.

Antistoffet CA4 anvendes til immunoindfangningen, medens an-
tistoffet CA12 mærket med peroxydase anvendes til bestemmelse
30 under betingelserne i eksempel 1.

De ved 492 nm målte optiske tætheder for fordybningerne inde-
holdende de indførte celler og for kontrolprøven uden celler
er henholdsvis 1,025 og 0,080.

Eksempel 15

Immunoenzymometrisk bestemmelse udført på magnetiske kugler: bestemmelse af antigen CD5 på humane T-lymfocytter med et konjugat af antistof mærket med acetylcholinesterase og en partikelformet bærer dannet af magnetiske kugler.

Bæreren, der anvendes til indfangning af cellerne, udgøres af magnetiske kugler DYNABEADS. Kuglerne med betegnelsen DYN-11101, der forhandles af BIOSYS, bærer på deres overflade et antistof anti-CD2, som er i stand til at fikserer alle T-lymfocytterne i en undersøgt prøve. Disse kugler behandles endvidere med en opløsning af antistof anti-CD2 før brugen for at forbedre udførelsen af bestemmelsen.

15

Til dette formål blandes 10 μ l af kuglesuspensionen med 1 ml opløsning af antistof med 25 μ g/ml i stødpude PBS i 1 time under mild omrøring. Kuglerne bliver derefter vasket 4 gange med stødpude PBS og opbevares så i 4 ml stødpude PBS.

20

Til bestemmelsen indfører man i rækkefølge i et glas på 5 ml: 200 μ l kuglesuspension, 80 μ l suspension af enkernede celler udskilt af totalt blod ved hjælp af Ficoll-Paque (Pharmacia), og derefter tilsættes 280 μ l konjugat af antistof ST1 mærket med acetylcholinesterase identisk med det, der blev anvendt i eksempel 6.

25

Efter 1 time under mild omrøring fraskilles kuglerne ved hjælp af en magnet, og cellerne fikseret på kuglerne vaskes med en stødpude PBS (5 vaskninger).

30

Acetylcholinesterasen fikseret på cellerne afsløres på samme måde som i eksempel 6. Det fremkomne signal for optisk tæthed er 0,168 i nærværelse af de mærkede celler, og blindprøven uden celler viser 0,062.

35

P a t e n t k r a v .

1. Udstyr til immunometrisk bestemmelse af et overfladeantigen, der er karakteristisk for en population eller underpopulation af celler, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter:
- 5
- a) en fast bærer, hvorpå der ved covalent binding eller ved fysisk adsorption er fikseret et eller flere monoklonale antistoffer rettet mod overfladeantigenerne på cellepopulationen, som skal bestemmes, udover det nævnte karakteristiske antigen,
- 10
- b) en eller flere opløsninger, der hver indeholder et monoklonalt antistof, som er specifikt for det nævnte antigen, der er karakteristisk for den population eller underpopulation af celler, som skal bestemmes, og som er mærket med en radioaktiv sonde eller en enzymatisk sonde,
- 15
- c) hvis det drejer sig om antistof mærket med en enzymatisk sonde en eller flere opløsninger, som indeholder de reagenser, der er nødvendige til at afsløre enzymets aktivitet,
- 20
- d) eventuelt en yderligere bestanddel, der udgøres af en vaskeopløsning af stødpude og/eller prøver, der muliggør kalibrering og kontrol af kvaliteten af bestemmelsen.
- 25
2. Udstyr ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at bestanddelen (a) er en fast bærer, der udgøres af en mikrotitre-ringsplade, i hvis fordybninger der er fikseret det eller de antistoffer, der er beregnet til at immobilisere cellerne, blandt hvilke der findes celler af den population eller underpopulation som bærer antigenet, der skal bestemmes.
- 30
3. Udstyr ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at bestanddelen (a) er en partikelformet magnetisk bærer.
- 35
4. Udstyr ifølge krav 1 til 3, k e n d e t e g n e t ved, at bestanddelen (a) udgøres af en fast bærer, hvorpå der er fik-

seret et eller flere monoklonale antistoffer HLA af klasse I.

5. Udstyr ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at det fikserede monoklonale antistof er antistoffer kaldet S-klasse
5 I.

6. Udstyr ifølge krav 1 til 3, k e n d e t e g n e t ved, at de monoklonale antistoffer i bestanddel (b) er mærket med en radioisotopsonde af jod 125 eller jod 131.

10

7. Udstyr ifølge krav 1 til 3, k e n d e t e g n e t ved, at de monoklonale antistoffer i bestanddel (b) er mærket med en enzymatisk sonde.

15 8. Udstyr ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at de monoklonale antistoffer i bestanddel (b) er mærket med peroxydase, og at bestanddelen (c) omfatter i det væsentlige oxygeneret vand og et chromogen valgt blandt orthophenylendiamin, 2,2'-azino-bis(3-ethyl-6-benzothiazolinsulfonsyre), 3,3'-diaminobenzidin, 3-amino-9-ethylcarbazol eller et af deres vandopløselige salte.
20

9. Udstyr ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at de monoklonale antistoffer i bestanddel (b) er mærket med alkalisk
25 phosphatase og at bestanddel (c) udgøres af paranitrophenylphosphat, 4-methylumbelliferylphosphat eller 5-brom-4-chlor-3-indolylphosphat.

10. Udstyr ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at de
30 monoklonale antistoffer i bestanddel (b) er mærket med β -galactosidase, og at bestanddelen (c) udgøres af orthonitrophenyl- β -D-galactopyranosid eller 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid.

35 11. Udstyr ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at de monoklonale antistoffer i bestanddel (b) er mærket med acetylcholinesterase, og at bestanddel (c) omfatter i det væsentlige acetylthiocholin og 5,5'-dithio-2-nitrobenzoesyre eller et af deres vandopløselige salte.

12. Udstyr ifølge krav 1 til bestemmelse af et eller flere overfladeantigener på formede elementer i menneskeblod, såsom leukocytter, lymfocytter, T-lymfocytter, B-lymfocytter, granulocytter og blodplader.
- 5
13. Udstyr ifølge krav 12 til bestemmelse af antigenet CD4 eller CD8 på humane T-lymfocytter, som bærer dette antigen kaldet T4-lymfocytter eller T8-lymfocytter.
- 10
14. Udstyr ifølge krav 1 til bestemmelse af et eller flere overfladeantigener på en patogen mikroorganisme.
15. Udstyr ifølge krav 14, k e n d e t e g n e t ved, at den patogene mikroorganisme er *Candida albicans*.
- 15
16. Udstyr ifølge krav 1 til bestemmelse af et eller flere membranantigener på tumorceller.
17. Udstyr ifølge krav 16, k e n d e t e g n e t ved, at tumorcellerne er cancerceller i urinvejene eller en af cellerne i maligne hæmopatier.
- 20
18. Udstyr ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at bestanddelen (a) er en mikrotitreringsplade i hvis fordybninger der er fikseret et eller flere monoklonale antistoffer, der er specifikke for overfladeantigener på en cellepopulation, og bestanddelen (b) udgøres af flere opløsninger, der hver indeholder et monoklonalt antistof, der er specifikt for et overfladeantigen på en celleunderpopulation, som udgør en væsentlig del af den fikserede cellepopulation.
- 25
- 30
19. Udstyr ifølge krav 18 til bestemmelse af antigener, der er specifikke for lymfocytunderpopulationerne T, T4, T8 og B.
- 35
20. Udstyr ifølge krav 18 til karakterisering og bestemmelse af de forskellige antigener, der udgør den antigene udrustning på overfladen af tumorceller af maligne hæmopatier.

21. Fremgangsmåde til immunometrisk bestemmelse af overfladeantigener på en population eller underpopulation af celler, k e n d e t e g n e t ved, at den består i:

- 5 a) at immobilisere cellepopulationen som bærer antigenet, der skal bestemmes eller en cellepopulation omfattende den underpopulation, som bærer antigenet, der skal bestemmes på en fast bærer ved anvendelse af et eller flere monoklonale antistoffer, der forud er fikseret ved covalent binding eller ved fysisk adsorption på bæreren og i stand til at genkende et antigen, der findes på overfladen af cellerne udover antigenet som skal bestemmes,

15 og i samme trin direkte at mærke populationen eller underpopulationen af celler, som skal bestemmes, ved hjælp af mindst et monoklonalt antistof, der er specifikt for antigenet, der skal bestemmes, hvilket antistof bærer en radioisotopsonde eller enzymatisk sonde,

- 20 b) overholde en inkubationsperiode,

c) vaske bæreren for at fjerne de ikke immobiliserede celler og overskud af antistof,

- 25 d) hvor det drejer sig om antistof, som bærer en enzymatisk sonde, at tilsætte det eller de nødvendige reagenser (substrat og chromogen) til at afsløre enzymaktiviteten,

30 e) aflæse resultaterne enten ved tælling af radioaktiviteten eller ved måling af lyssignaler (farvning eller fluorescens), idet der eventuelt sammenlignes med en kalibreringskala.

22. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t ved, at den faste bærer er som defineret i et af kravene 1 eller 2.

35

23. Fremgangsmåde ifølge krav 21 eller 22, k e n d e t e g n e t ved, at de til markering bestemte monoklonale antistoffer bærer en enzymatisk sonde.

24. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved, at den enzymatiske sonde er peroxydase og at enzymets aktivitet afsløres med oxygeneret vand og et chromogen valgt blandt orthophenylendiamin, 2,2'-azino-bis(3-ethyl-6-benzothiazolin-sulfonsyre), 3,3'-diaminobenzidin, 3-amino-9-ethylcarbazol eller et af deres vandopløselige salte.

25. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved, at den enzymatiske sonde er alkalisk phosphatase, og at enzymaktiviteten afsløres med paranitrophenylphosphat, 4-methylumbelliferylphosphat eller 5-brom-4-chlor-3-indolyolphosphat.

26. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved, at den enzymatiske sonde er β -galactosidase og at enzymaktiviteten afsløres med orthonitrophenyl- β -D-galactopyranosid eller 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid.

27. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved, at den enzymatiske sonde er acetylcholinesterase, og at enzymaktiviteten afsløres med acetylthiocholin og som chromogen 5,5'-dithio-2-nitro-benzoesyre eller et af deres vandopløselige salte.

28. Fremgangsmåde ifølge krav 21 eller 22, k e n d e t e g n e t ved, at det til markering bestemte monoklonale antistof bærer en radioisotopsonde af jod 125 eller jod 131.

29. Fremgangsmåde ifølge krav 21 eller 22, k e n d e t e g n e t ved, at den samlede varighed af udførelsen af bestemmelsen er lig med eller under 1 time.

30. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t ved, at de på den faste bærer fikserede monoklonale antistoffer er antistoffer HLA af klasse I.

35

31. Fremgangsmåde ifølge krav 30, k e n d e t e g n e t ved, at det på den faste bærer fikserede monoklonale antistof er antistoffet kaldet S-klasse I.

32. Fremgangsmåde ifølge krav 21 til bestemmelse af et eller flere overfladeantigener på formede elementer i menneskeblod.
33. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t ved, at de formede elementer i menneskeblod er leukocytter, lymfocytter, T-lymfocytter, T-lymfocytter, som bærer markøren CD4 kaldet T4-lymfocytter, T-lymfocytter, som bærer markøren CD8 kaldet T8-lymfocytter, B-lymfocytter, granulocytter, blodplader.
34. Fremgangsmåde ifølge krav 21 til bestemmelse af et eller flere overfladeantigener på en patogen mikroorganisme.
35. Fremgangsmåde ifølge krav 34, k e n d e t e g n e t ved, at den patogene mikroorganisme er *Candida albicans*.
36. Fremgangsmåde ifølge krav 21 til bestemmelse af et eller flere membranantigener på tumorceller.
37. Fremgangsmåde ifølge krav 26, k e n d e t e g n e t ved, at tumorcellerne er cancerceller i urinvejene, eller celler af maligne hæmopatier.
38. Fremgangsmåde ifølge krav 21 og 22 bestående i at immobilisere en cellepopulation på en mikrotitreringsplade med et eller flere monoklonale antistoffer, der er specifikke for overfladeantigener på denne population, og samtidig direkte at mærke celleunderpopulationer, som er en væsentlig del af den fikserede population, ved hjælp af flere opløsninger, der hver indeholder et monoklonalt antistof, der hvert er specifikt for et overfladeantigen på en de celleunderpopulationer, som skal bestemmes.
39. Fremgangsmåde ifølge krav 38 til bestemmelse af antigener, der er specifikke for lymfocytunderpopulationerne T, T4, T8 og B.
40. Fremgangsmåde ifølge krav 38 til karakterisering og bestemmelse af forskellige antigener, der udgør den antigene ud-

rustning på overfladen af tumorceller af maligne hæmopatier.

5

10

15

20

25

30

35