

(19)



(10) **LT IP1407 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP1407**

(51) Int. Cl. (2006): **G01N 33/535**
G01N 33/536
G01N 33/577
G01N 33/58

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 10 18**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 05 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **48709/88, 1988 12 23, IT**
PCT/EP89/01612, 1989 12 22, EP
4895771, 1991 07 21, SU

(71) Pareiškėjas:
APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING NV, 6, John B. Gorsiraweg,
Curacao (AN), NL

(72) Išradėjas:
Franco CELADA, IT
Gyorgyo GOROG, HU

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
—

(54) Pavadinimas:

Homogeninio imunofermentinio tyrimo būdas ir tyrimui naudojamas rinkinys

(57) Referatas:

—

HOMOGENINIO IMUNOFERMENTINIO TYRIMO BŪDAS IR TYRIMUI NAUDOJAMAS RINKINYS

Aprašymas

Šis išradimas skirtas homogeniniam imunofermentiniam tyrimui, kurio tikslas yra ligando kiekio skystame tiriamajame pavyzdyje nustatymas, ir medžiagoms tokiems tyrimams atlikti.

Šiame aprašyme terminas "ligandas" naudojamas pažymėti kokiai nors medžiagai (pavyzdžiui, antigenui, antikūnui), prieš kurią gali būti pagaminti antiligandai (pavyzdžiui, antikūnai ir anti-antikūnai) ir atitinkamai į jų sferą įeina haptenai, kurie gali būti padaryti imunogeniškais, norint gauti antikūnus.

Imuninio tyrimo metodikoje tikimasi, kad tarp tiriamo antigeno ir antikūnų, kurie pridedami atliekant tyrimą, susidarys kompleksas. Jo sudėtis priklauso nuo antigeno kiekio: "antikūninio" komplekso susidarymas yra kontroliuojamas.

Yra žinoma keletas imuninio tyrimo būdų, kuriuose naudojami žymėtieji antikūnai, todėl jie yra analitiškai identifikuoti. "Sendvičo" arba "Dviejų saitų" metodikoje laikoma, kad susidaro kompleksas tarp antigeno ir dviejų reagentų-antikūnų. Patogus komplekso susidarymo tarp antigeno skystame mėginyje ir dviejų reagentų-antikūnų nustatymo metodas yra vieno žymėto reagento-antikūno ir nežymėto reagento, kuris susiriša su kieta faze, panaudojimas ir komplekso atskyrimo galimybė. Ši metodika, kur "žyme" naudojamas radioaktyvumas, žinoma kaip imunoradiometrinis tyrimas (IRMT).

Šitokio tipo tyrimuose sunkumą sudaro pakankamai švaraus "žymėto" antikūno gavimas. Tai, nors ir įmanoma, yra laboratorinė operacija ir aišku yra brangi. Neseniai problema šiek tiek

palengvėjo ryšium su monokloniniais antikūnais. "Sendvičo"-tipo imuniniai tyrimai, kuriuose tikimasi naudoti du monokloninius antikūnus (reagentus) - žymėtą tirpų monokloninį antikūną ir monokloninį antikūną, kuris susiriša su vandenyje netirpia kieta faze - aprašyti, pavyzdžiui, Europos patento Nr.0048357 aprašyme.

Aukščiau aprašytos metodikos charakteringa ypatybė yra ta, kad paprastai yra reikalingas ilgas inkubacinis periodas, kad pilnai įvyktų (tiek, kiek įmanoma) reakcija. Taip yra dėl to (bent jau dalinai), kad antigenas tirpale sąveikauja su antikūnu, surištu kietoje fazėje.

Norint pašalinti šias problemas, buvo atlikti homogeniniai imuniniai tyrimai. Vis dėlto, jų panaudojimas apsiriboja vaistų, hormonų ir plazmos baltymų nustatymu. Homogeniniai imuniniai tyrimai, žinomi EMIT pavadinimu (Biochem. Biophys. Res. Commun., 47:846, 1972), buvo sėkmingai panaudoti nedidelių molekulių - panašių į steroidus hormonų - nustatymui. Patobulintame EMIT metode naudojamo, nustatymui fermento aktyvumas sumažėja, kai konjugatas fermentas-haptenas (E-L) yra surištas su antikūnu (AK). Matyt, taip yra dėl to, kad arba sumažėja substrato (S) giminigumas fermento aktyviam centrui, kai yra AK, arba susidaro erdviniai trukdymai, arba pakinta fermento struktūra. Kitas EMIT tipas paremtas tuo, kad konjuguotu haptenu inhibuojamas fermentinis "pėdsakas". "Pėdsakas" vėl tampa aktyvus, jeigu antikūnas (AK) prieš haptaną (L) suriša hapteno-fermento (E-L) konjugatą. Šio būdo variantas buvo surastas didelėms antigenų molekulėms (Anal. Biochem., 102:167, 1980), panašioms į IgG, tačiau skelbiama, kad šio varianto jautrumas yra mažas. Fluorescencijos sužadinimo imuninis tyrimas (J. Biol. Chem., 251:4172, 1976) paremtas energija, kuri perduodama tarp dviejų fluorescuojančių molekulių (antikūno ir antigeno). Be to, laisvas "analitas" (analizuojamoji medžiaga) inhibuoja komplekso tarp antikūno ir žymėto antigeno susidarymą.

Būdas, kuriame naudojamas fermentas (ECIA) (Anal. Biochem., 1056:223, 1979) (Appl. Biochem. Biotechnol., 6, 53-64, 1981), numato antikūno ir antigeno (žymėto) su dviem skirtingais fermentais panaudojimą taip, kad pirmos fermentinės reakcijos produktas yra antrosios substratas. Bendras reakcijos greitis labai padidėja, jeigu du fermentai naudojami kartu vietoj to, kad jie

jie būtų atskirai tirpale. Kitos panašios metodikos, kuriose tyrimui naudojama antigen-žymėta fluorescencinė apsauga (Clin. Chem., 25:1077, 1979), taip pat priimtinos dėmesin.

Bispecifiniai monokloniniai antikūnai (BSMAK) - antikūnai, kuriuose imunoglobulino molekulės surištos padėtys reaguoja su dviem skirtingais antigeniniais determinantais. Be to, BSMAK gali tuo pačiu metu sąveikauti su skirtingais antigenais.

Bispecifiniai monokloniniai antikūnai gaunami chemiškai sujungiant vienvalenčius fragmentus, gautus iš dviejų monokloninių antikūnų. Alternatyvus gavimo būdas yra visų monokloninių antikūnų (įvairių savybių) kovalentinis sujungimas, panaudojant heterobifunkcinį susiuvimą. Trečias bispecifinių monokloninių antikūnų gavimo būdas - kryžminis sujungimas - buvo aprašytas 1983 m (Nature, 305, 537-540, 1983; Human Immunol., 12 : 213, 1985; Science, 229 : 81, 1981). Tokie antikūnai panaudoti „kietuose“ imunofermentiniuose tyrimuose ir histochemijoje, šiuose būduose pakeičiant antikūno-fermento konjugatus. Taip pat buvo pasiūlyta (Biotech. Appl. and Research, Technomic, Lancaster, U.K., p. 401-409, 1986) panaudoti bispecifinius antikūnus homogeniniuose imuniniuose tyrimuose.

Jeigu viena iš hibridinio antikūno surištų padėčių sujungta su dvivalenčio (arba daugiavalenčio) "analito" (ligando) epitopu, o kita padėtis - su dvivalenčio (arba daugiavalenčio) fermento epitopu, analito buvimas, laikant galimu ciklinių kompleksų susidarymą, gali padidinti antikūno ir fermento ryšį.

Antikūnų ryšio efektyvumo padidėjimą dėl ciklinių kompleksų susidarymo aprašė kai kurie autoriai (Trends Biochem., 9, 1, 1984).

Šio išradimo tikslas - surasti homogeninio imuninio tyrimo būdą, tinkamą daugeliui ligandų.

Pagal pirmą šio išradimo aspektą siūlomas ligando, esančio skystame tiriamajame pavyzdyje, homogeninio imuninio tyrimo būdas, į kurį įeina:

a) inkubavimas mišinio, susidedančio iš:

1) skysto tiriamojo pavyzdžio;

li) tuo atveju, jeigu naudojamas bandomasis ligandas turi tik vieną epitopą - kovalentinio ligando junginio su kokia nors mono- arba poliepitopine molekule, tu-

rinčia bent vieną epitopą, skirtingą nuo ligando epitopo;

- 2) nestabilaus fermento, kuris yra mažiausiai dimerų formoje, arba turi mažiausiai du skirtingus epitopus;
- 3) pirmo bispecifinio monokloninio antikūno, kuriame vienas paratopas gali apsaugoti fermento aktyvumą dėl ryšio su pirmu fermento epitopu, o likęs paratopas gali sudaryti ryšį su pirmu tiriamojo ligando epitopu; ir

- 4) antro bispecifinio monokloninio antikūno, kuriame arba (I) tuo atveju, kai minėtas fermentas yra mažiausiai dimerų formoje, pirmas paratopas yra funkciškai identiškas aukščiau minėto bispecifinio monokloninio antikūno, galinčio sudaryti panašų ryšį su fermentu, pirmam epitopui, arba (ii) tuo atveju, kai minėtas fermentas turi mažiausiai du skirtingus epitopus, pirmas paratopas gali sudaryti ryšį su antru fermento epitopu (nebūtinai fermento aktyvumui apsaugoti), o antrasis paratopas gali sudaryti ryšį su antru, skirtingu tiriamojo ligando epitopu arba (kai šis ligandas turi tik vieną epitopą) su kovalentinio junginio epitopu;

susidarant ketvirtiniam imunokompleksui;

- b) sumaišius, skystos fazės, kuri yra mišinys, paveikimas tokiomis sąlygomis, kuriose koks nors fermentas, nesantis ketvirtiniame komplekse, tampa neaktyvus; ir
- c) rasto fermento (jeigu yra), surišto dalinai į ketvirtinį imunokompleksą, kiekio nustatymas; ligando, surišto su šiuo kiekiu, jeigu galima, nustatymas tiriamajame pavyzdyje.

Naudojamas terminas "nestabilus fermentas" reiškia bet kokią fermentą, kuris tampa neaktyvus b) stadijoje naudojamose sąlygose.

Būdas paremtas antikūno sugebėjimu apsaugoti fermento aktyvumą, t.y. antikūno poveikiu į fermentą, neleidžiančiu jam prarasti aktyvumo b) stadijoje naudojamose sąlygose. Fermentas gali išlaikyti aktyvumą, kai jis yra dalinai surištas ketvirtiniame komplekse; taigi, fermento, dalinai surišto komplekse, kiekis gali būti nustatytas ir prieš tai neatlikus komplekso disociacijos. Panaudojant ketvirtinių (ciklinių) kompleksų, paremtų

bispecifiniais antikūnais susidarymą, nustatoma nestabilus fermentas ir analitas; tai duoda galimybę koreliuoti fermentinio aktyvumo, esančio po denatūracijos, kiekį su ligando, esančio pavyzdėje, kiekiu. Šis principas yra įvykdomas, kadangi susidaręs ciklinis kompleksas yra nepaprastai stabilus. Fermento molekulė ketvirtiniuose kompleksuose apsaugota nuo denatūracijos dėl ryšio su bispecifiniu antikūnu, tuo tarpu kai fermento molekulės, nedalyvaujančios ketvirtiniame imunokomplekse, denatūruojasi šio apdorojimo metu. Be to, bet kokie necikliniai antikūno-fermento kompleksai turi tendenciją disocijuoti denatūracijos sąlygose, ir stebimas fermento aktyvumo praradimas. Šis efektas didėja, kai antikūno giminingumas fermentui santykinai mažas. Taigi, pasirenkant monokloninius antikūnus, turinčius tam tikrą giminingumą fermentui, minėtą aktyvumą galima sumažinti iki minimumo. Į ketvirtinį kompleksą gali įeiti daugiau negu du bispecifiniai monokloniniai antikūnai. Tokiu atveju kiekvienas komplekse esantis antikūnas surištas su ligandu (arba molekulės-ligando konjugatu) ir fermentu.

Buvo pastebėta, kad "skirtingais epitopais" gali būti funkciškai identiškai epitopai (bet skirtingose ligando, ligando-molekulės konjugato arba fermento padėtyse) arba funkciškai skirtingi epitopai.

Jeigu ligandas turi tik vieną epitopą, atitinkamas sujungtas ligandas (su kokia nors mono- arba poli-epitopine molekule) gali būti lengvai gaunamas aprašytu būdu. Pagal tinkamiausią išradimo aspektą, "nestabilus fermentas" yra termonestabilus fermentas. Termonestabilūs fermentai - fermentai, kurių aktyvumą veikia temperatūra. Bet koks termolabilus fermentas šildant tampa neaktyvus. Pavyzdžiui, tinkamu termolabilaus tipo fermentu yra fermentas beta-galaktozidazė^k, kuri denatūruojasi nuo šilumos 62 °C temperatūroje, susidarant neaktyviam fermentui. Tinkami monokloniniai antikūnai, apsaugantys fermentą beta-galaktozidazę nuo temperatūrinės (šiluminės) denatūracijos 62 °C temperatūroje, aprašyti Eur. J. Immunolog., 1978, 9, 688-692 ir P.N.A.S., USA, 78 : 2478, 1981.

Specialistui aišku, kad pagal šį išradimą galima lengvai patikrinti tyrimą.

Be to, išradimas numato aprūpinimą medžiagų, reikalingų aukščiau aprašytoms imuninio tyrimo operacijoms atlikti, rinkiniu.

Pagal šį išradimo aspektą, siūlomas rinkinys, naudojamas aukščiau aprašyto būdo realizavimui, į kurį įeina:

- (i) nestabilus fermentas;
- (ii) pirmasis bispecifinis monokloninis antikūnas; ir
- (iii) antrasis bispecifinis monokloninis antikūnas pagal aukščiau duotą aprašymą.

Į rinkinį taip pat gali įeiti kovalentinis ligando junginys su bet kokia mono- arba poli-epitopine molekule, turinčia bent vieną, skirtingą nuo ligando epitopą.

Į nurodytą rinkinį gali taip pat įeiti tikslus (etaloninis) tirpalas.

Pagrindinis šio išradimo būdo ir jo realizavimo priemonių privalumas yra tas, kad surištas ir laisvas nestabilūs reagentai yra atskiriami. Be to, homogeninį imuninį tyrimą galima išplėsti ir taikyti polivalentiniams ligandams.

Ligandu gali būti antikūnas, ir šiuo atveju pirmasis ir antrasis bispecifiniai monokloniniai antikūnai gaunami, išeinant iš anti-antikūnų.

Jeigu ligandas yra medžiaga, galinti specifiškai susirišti su antikūnu, pavyzdžiui, antigenas, bispecifiniu monokloniniu antikūnu gali būti tipiškas bispecifinis monokloninis antikūnas, t.y. gautas, išeinant iš monokloninių antikūnų.

Išradime siūlomas būdas turi labai platų pritaikymą, tačiau, konkrečiai imant, gali būti naudojamas tiriant: hormonus, įskaitant peptidinius hormonus (pavyzdžiui, tiroidus stimuliuojantį hormoną (TSH), liutenizuojantį hormoną (LH), chorioninį gonadotropiną (žmogaus) (ChH), folikulus stimuliuojantį hormoną (FSH), insuliną ir prolaktiną) arba nepeptidinius hormonus (pavyzdžiui, steroidinius hormonus, tokius kaip kortizolis, estradiolis, progesteronas ir testosteronas, arba tiroidinius hormonus, tokius kaip tiroksinas (r_4) ir trijodtironinas), baltymus (pavyzdžiui, karcinoembrioninį antigeną (KEA) ir alfa-fetoproteiną (AFP)), vaistus (pavyzdžiui, digoksiną), cukrus, toksinus, vitaminus,

baltymus, virusus - tokius kaip gripo, para-gripo, adeno-, pefatitiną, respiratorinį ir AIDS-virusus, arba mikroorganizmus. Specifiniu realizavimo atveju mes naudojame jį karcinoembrioninio antigeno (KEA) nustatymui.

Surištas D6C9, monokloninis antikūnas (aprašytas P.N.A.S., USA, 78 : 2478, 1981) apsaugo E. coli beta-galaktozidazę (GZ) nuo terminės denatūracijos. GZ, kuri yra tetramerinis fermentas, - daugiavalentė epitopo, veikiamo terminės denatūracijos, atžvilgiu.

Karcinoembrioninis antigenas (KEA) yra monomerinis. Įskaitant privalumą, kad yra du skirtingi epitopai (KEA-1 ir KEA-2), KEA tyrimas buvo išstobulintas, panaudojant kartu dvi hibridinių antikūnų padėtis. Kiekvienas hibridinis antikūnas turėjo D6C9-anti-GZ surištą padėtį, o kita surišta padėtis nukreipta prieš epitopą KEA-1 arba prieš epitopą KEA-2.

Kiti tinkamiausi specifiniai realizavimo variantai iliustruoja išradimą kaip pavyzdys.

1 paveiksle schematiškai parodomas ketvirtinis imunokompleksas, sudarytas pagal išradime siūlomą būdą.

Toliau duodamame pavyzdyje temperatūros nurodytos Celsijaus laipsniais.

Pavyzdys

KEA imuninis tyrimas

1. Karcinoembrioninio antigeno (KEA) gavimas

KEA išskirtas iš gaubtinės ir tiesiosios žarnos (colorectal) karcinomos Krupey et al. (Immunochemistry, 1972, Vol.9, p. 617-622) metodu, kurį išstobulino Sluyter et al. (Cancer Research, 36, 1696-1704, May, 1976).

2. Fermentas beta-galaktozidazė

Beta-galaktozidazė (tipas VI) buvo gauta iš Sigma. Fermento aktyvumas išmatuotas, substratu panaudojant o-nitrofenil-beta-galaktozidą (ONFG, Sigma).

3. Monokloniniai antikūnai (monospecifiniai) prieš KEA

Anti-KEA-monokloniniai antikūnai buvo gauti pagal Kohler and Milstein (Nature, 1975, 256, p. 495-7) metodiką. Du monokloniniai

antikūnai atskirti, panaudojant EDISA, kuriame KEA padengiama kieta faze. Du monokloniniai antikūnai buvo pažymėti KEA-1 ir KEA-2.

4. Monokloninis antikūnas (monospecifinis) prieš beta-galaktozidazę

Beta-galaktozidazė iš *E. Coli* susideda iš keturių vienodų subvienetų. Anti-beta-galaktozidazės monokloniniai antikūnai buvo gauti pagal Kohler and Milstein (žr. aukščiau) metodiką. Gauti anti-beta-galaktozidazės monokloniniai antikūnai buvo panaudoti beta-galaktozidazės aktyvumui apsaugoti nuo terminės denatūracijos, kaip aprašyta Celada, P.N.A.S., USA, 78, 2478, 1981.

Vienas iš hibridinės masės, gautos apsaugant anti-beta-galaktozidazės monokloninį antikūną, elementų buvo pažymėtas D6C9.

5. Pirmojo (KEA-1xD6C9) ir antrojo (KEA-2xD6C9) bispecifinių monokloninių antikūnų gavimas

Bispecifiniai monokloniniai antikūnai buvo gauti pagal Parham (Human Immunol., 12 : 213, 1985) aprašymą. Išmatuotas abiejų kombinacijų - (KEA-1xD6C9) ir (KEA-2xD6C9) - hibridinių antikūnų aktyvumas. Du specifiniai monokloniniai antikūnai buvo valyti jonų mainų chromatografijos per mono-Q-dervą (Pharmacia) būdu, panaudojant FPLC (Pharmacia) prietaisą.

6. Bispecifinio antikūno tyrimas

Buvo pagaminti mikromėginiai su KEA (1 μ g/ml) PBS buferyje ir imobilizuoti BSA 1 %-niu albuminu. Hibridinis antikūnas buvo išlaikytas lėkštelėje 1 valandą 37 °C temperatūroje. Perplovus, pridėta 1 μ g/ml beta-galaktozidazės ir išlaikyta 1 val. 37 °C temperatūroje. Beta-galaktozidazės perteklius išplautas (tol, kol neliko) ir pridėta ONFG. Spalvinė reakcija 37 °C temperatūroje vyko 1 valandą.

7. Homogeninis imuninis tyrimas

Į mikromėginius pridėta 100 μ l pagamintų bispecifinių antikūnų, 50 μ l beta-galaktozidazės (1 μ g/ml) ir 50 μ l KEA (koncentracija 0-10 μ g/ml) 1 %-niame albumino (žmogaus) tirpale PBS buferyje kambario temperatūroje ir laikyta 10 minučių. Po to pašildyta 62 °C temperatūroje (vandens vonioje) 1 valandą.

Greitai atšaldyta vandeniu ir pridėta 50 μ l ONFG ir po 20-30 minučių reakcija buvo sustabdyta. Optinis tankis matuotas esant 405 nm bangos ilgiui.

Fermento aktyvumas dėl ketvirtinio imunokomplekso susidarymo didėjo iki 75 ng/ml KEA koncentracijos. Esant šiai koncentracijai, fermento aktyvumas mažėja ir pasiekia nulį, esant 600 ng/ml, kas rodo, kad esant didelėms KEA koncentracijoms, ketvirtinis imunokompleksas disocijuoja.

Išradimo apibrėžtis

1. Ligando, esančio skystame tiriamajame mišinyje, homogeninio imuninio tyrimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jį įeina:

a) inkubavimas mišinio, susidedančio iš:

1) skysto tiriamojo pavyzdžio;

1i). tuo atveju, jeigu naudojamas bandomasis ligandas turi tik vieną epitopą - kovalentinio ligando junginio su kokia nors mono- arba poliepitopine molekule, turinčia bent vieną epitopą, skirtingą nuo ligando epitopo;

2) nestabilaus fermento, kuris yra mažiausiai dimerų formoje, arba turi mažiausiai du skirtingus epitopus;

3) pirmo bispecifinio monokloninio antikūno, kuriame vienas paratopas gali apsaugoti fermento aktyvumą dėl ryšio su pirmu fermento epitopu, o likęs paratopas gali sudaryti ryšį su pirmu tiriamojo ligando epitopu; ir

4) antro bispecifinio monokloninio antikūno, kuriame arba (i) tuo atveju, kai minėtas fermentas yra mažiausiai dimerų formoje, pirmas paratopas yra funkciškai identiškas aukščiau minėto bispecifinio monokloninio antikūno, galinčio sudaryti panašų ryšį su fermentu, pirmam epitopui, arba (ii) tuo atveju, kai minėtas fermentas turi mažiausiai du skirtingus epitopus, pirmas paratopas gali sudaryti ryšį su antru fermento epitopu (nebūtinai fermento aktyvumui apsaugoti), o antrasis paratopas gali sudaryti ryšį su antru, skirtingu tiriamojo ligando epitopu arba (kai šis ligandas turi tik vieną epitopą) su kovalentinio junginio epitopu;

susidarant ketvirtiniam imunokompleksui;

b) sumaišius, skystos fazės, kuri yra mišinys, paveikimas tokiomis sąlygomis, kuriose koks nors fermentas, nesantis ketvirtiniame komplekse, tampa neaktyvus; ir

c) rasto fermento (jeigu yra), surišto dalinai į ketvirtinį imunokompleksą, kiekio nustatymas; ligando, surišto su šiuo kiekiu, jeigu galima, nustatymas tiriamajame pavyzdyje.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nestabilus fermentas yra termiškai nestabilus fermentas.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad termiškai nestabilus fermentas yra beta-galaktozidazė.

4. Būdas pagal 2 arba 3 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fermentas tampa neaktyvus, kai įvyksta terminė denatūracija.

5. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad terminė denatūracija vyksta 62 °C temperatūroje.

6. Būdas pagal bet kurį iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nustatomas "analitas" yra karcinocembrioninis antigenas (KEA).

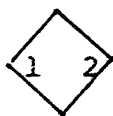
7. Priemonių, naudojamų būdo pagal bet kurį iš 1-6 punktų, realizavimui, rinkinys, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jį įeina:

- (i) nestabilus fermentas;
- (ii) pirmas bispecifinis monokloninis antikūnas; ir
- (iii) antras bispecifinis monokloninis antikūnas, skirtas panaudojimui pagal bet kurį iš 1-6 punktų.

8. Priemonių pagal 7 punktą rinkinys, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad be to į jas įeina ligando junginys su kokia nors mono- arba poliepitopine molekule, kurioje yra bent vienas epitopas, skirtingas nuo ligando epitopo.

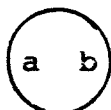
9. Priemonių pagal 7 arba 8 punktą rinkinys, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jį įeina taip pat ir etaloninis (tikslus) tirpalas.

(1):



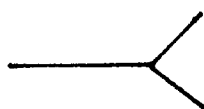
Poliepitopinis "analitas" (1 ir 2 - skirtingi epitopai) arba monoepitopinio "analito" ir mono- arba poliepitopinės molekulės, skirtingos nuo "analito", junginys.

(2)



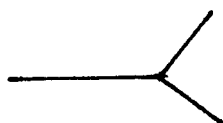
Nestabilus fermentas, turintis mažiausiai du skirtingus epitopus a ir b. Fermento aktyvumas yra apsaugotas, kai vienas iš a arba b epitopų surištas su atitinkamu antikūnu.

(3)



Bispecifinis monokloninis antikūnas su dviem skirtingomis rišančiomis padėtimis, skirtoms epitopams 1 ir a.

(4)



Bispecifinis monokloninis antikūnas su dviem skirtingomis rišančiomis padėtimis, skirtoms epitopams 2 ir b.

Ketvirtinis imuninis kompleksas (arba ciklinis tipas):

