

OZET**SİNYAL AMPLİFİKASYONU İMMUNODENEYLERİ**

- 5 Mevcut buluş, bir test örneği içinde antikorların saptanmasını güçlendirmede faydalı yöntemler, cihazlar, kompozisyonlar (örn. yakalama kompleksleri) ve kitler sunar. Yöntemler, cihazlar ve kompozisyonlar, immünodeneylerde, örneğin lateral akış deneylerinde saptanan bir antikorun sinyalini amplifiye etmek için saptanabilen Fc
- 10 bağlanma molekülleri örneğin Protein A, Protein G ve/veya Fc'ye spesifik bir antikor kullanır.

İSTEMLER

1. Bir test örneği içinde bir antikorun varlığının saptanmasına yönelik, aşağıdakileri içeren bir yöntem:

- 5 (a) test örneği, bir birinci dedektör ve bir ikinci dedektör ile temas ettirilerek birinci dedektörü, ikinci dedektörü ve antikoru içeren bir birinci kompleksin oluşturulması, buradaki birinci dedektör, bir birinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir Fc bağlanma molekülü içerir; adı geçen Fc bağlanma molekülü, antikorun Fc bölgesine spesifik olarak bağlanabilir ve buradaki ikinci dedektör, bir ikinci saptanabilen
10 öğeye konjüge edilmiş bir antijen veya antijenik peptit içerir; adı geçen antijen veya antijenik peptit, antikorun bir değişken bölgesine spesifik olarak bağlanabilir;
- (b) birinci kompleksin, bir yüzeyin bir test bölgesi üzerinde
15 immobilize edilmiş bir yakalama ögesi ile temas ettirilmesi, buradaki yakalama ögesi, antikora bağlanır, buradaki antikor; birinci dedektör, ikinci dedektör ve yakalama ögesi ile bir yakalama kompleksi oluşturur, bu şekilde yakalama kompleksi, test bölgesi üzerinde immobilize edilir; ve
- 20 (c) test bölgesinde birinci saptanabilen öğeden gelen bir sinyalin varlığının saptanması, burada sinyalin varlığı, test örneği içinde antikorun varlığının göstergesidir.

2. İstem 1'e ait yöntem, buradaki birinci dedektör, yüzeyin bir
25 konjüгат bölgesine immobilize edilir ve burada konjüгат bölgesi, yüzeyin test bölgesi ile çakışmaz.

3. İstem 1'e ait yöntem, burada Fc bağlanma molekülü, protein A ve/veya protein G'dir.

4. İstem 1'e ait yöntem, burada yakalama ögesi, bir antijen veya antijenik peptittir.

5. İstem 4'e ait yöntem, burada adı geçen antijen veya antijenik peptit, kalpkurdu, Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia ewingii, Borrelia burgdorferi, Borrelia afzelii, Borrelia garinii, Anaplasma phagocytophilum, Anaplasma platys, kedigiller lösemi virüsü, parvovirüs, influenza A suşu, influenza B suşu, kuş gribi virüsü, respiratuar sinsitiyal virüs, Legionella, adenovirüs, rotavirüs, kedigiller immüno-eksiklik virüsü, insan immüno-eksiklik virüsü ve Grup A Streptococcus'tan oluşan gruptan seçilen bir organizmadandır.

15

6. İstem 1'e ait yöntem, burada birinci saptanabilen öge, bir metal nano-partikül, metal nano-kabuk, florofor veya renkli lateks partikülüdür.

7. İstem 6'ya ait yöntem, burada metalik nano-partikül veya metalik nano-kabuk, altın partikülleri, gümüş partikülleri, bakır partikülleri, platinyum partikülleri, kadmiyum partikülleri, kompozit partikülleri, altın delik küreleri, altın kaplı silika nano-kabukları ve silika kaplı altın kabuklarından oluşan gruptan seçilir.

25

8. İstem 1'e ait yöntem, burada birinci ve ikinci dedektör, bir konjüгат bölgesi üzerinde immobilize edilir, buradaki konjüгат bölgesi, yüzeyin test bölgesi ile çakışmaz.

9. İstem 2 veya 8'e ait yöntem, burada konjüгат bölgesi ayrıca bir kontrol dedektörü içerir.

10. İstem 1'e ait yöntem, burada birinci ve ikinci saptanabilen öğeler aynıdır, isteğe bağlı olarak burada birinci ve ikinci saptanabilen öğeler, altın nano-partikülleridir.

11. İstem 1'e ait yöntem, burada ikinci dedektörün adı geçen antijeni veya antijenik peptidi, kalpkurdu, Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia ewingii, Borrelia burgdorferi, Borrelia afzelii, Borrelia garinii, Anaplasma phagocytophilum, Anaplasma platys, kedigiller lösemi virüsü, parvovirüs, influenza A suşu, influenza B suşu, kuş gribi virüsü, respiratuar sinsitiyal virüs, Legionella, adenovirüs, rotavirüs, kedigiller immüno-eksiklik virüsü, insan immüno-eksiklik virüsü ve Grup A Streptococcus'tan oluşan gruptan seçilen bir organizmadandır.

12. İstem 1'e ait yöntem, burada birinci dedektör ve ikinci dedektör, yaklaşık 20:1 ila yaklaşık 1:1'lik bir oranda bulunur.

13. İstem 12'ye ait yöntem, burada birinci dedektör, bir birinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir Fc bağlanma molekülü içerir ve burada Fc bağlanma molekülü, protein A ve/veya protein G'dir.

14. İstem 1'e ait yöntem, burada yüzey, bir lateral akış deneyi cihazında bir akış yolu veya bir analitik rotorda bir akış yoludur ve buradaki test örneği, bir vücut sıvısı, bir vücut organından özüt, kan, serum veya plazmadır.

15. İstem 2'ye ait yöntem, burada örnek, ikinci dedektör ve birinci dedektör ile herhangi bir sırada veya ardışıklıkta karıştırılır.

16. İstem 1'e ait yöntem, burada ikinci dedektör, bir ikinci
5 saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir Ehrlichia antijenik peptidi veya bunun bir karışımıdır.

17. İstem 1'e ait yöntem, burada birinci dedektör ve ikinci dedektör, yaklaşık 16:1 ila yaklaşık 2:1, isteğe bağlı olarak yaklaşık 4:1'lik bir
10 oranda karışım halinde bulunur.

15

20

25

24974

TARİFNAME

SİNYAL AMPLİFİKASYONU İMMUNODENEYLERİ

5

BULUŞUN ARKA PLANI

İmmünodeneyler sıklıkla diğer kullanımların yanı sıra enfeksiyöz ajanları tanımlamak için kullanılır. Bazı immünodeneyler, örneğin enfeksiyöz ajanın bir veya daha fazla benzersiz antijenine spesifik olarak bağlanan konakçı antikorların varlığı test edilerek bu enfeksiyöz ajana verilen konakçı immünolojik tepkilerine dayanır. İmmünodeney sistemlerinin sayısız türü, büyük, otomatik merkezi laboratuvar sistemleri ve nispeten basit tezgah üstü testler dahil olmak üzere tanı amaçlarıyla temin edilebilir. Bu immünodeneyler, geniş bir yelpazede test formatları, örneğin aglutinasyon deneyleri, presipitin deneyleri, enzim bağlı immünodeneyler, direkt flüoresan deneyleri, immüno-histolojik testler, komplement sabitleme deneyleri, serolojik testler, immüno-elektroforetik deneyler ve lateral akış ve genel akış testleri (yani, hızlı "strip" testleri) kullanır. İmmünodeneyler, çeşitli durumlar için hızlı, basit ve etkili tanı araçları sağlayabilir. Bununla birlikte duyarlılığı arttırılmış, gelişmiş immünodeneylere teknikte hala ihtiyaç vardır.

25 WO 2011/063235, Ehrlichia antikorlarının saptanmasına yönelik peptitler, cihazlar ve yöntemler açıklar.

WO 2011/063003 (US2011136155'in familya üyesi), Lyme hastalığı antikorlarının saptanması için peptitler ve yöntemler açıklar.

- 5 Hong W. ve arkadaşları: J. of Microbiological Methods, Cilt 83, no. 2, Kasım 2010, sayfa 133-140, Yersinia pestis'e karşı antikorların profillenmesi için yukarı dönüşümlü fosfor teknolojisi bazlı, 10 kanallı bir lateral akış deneyinin geliştirilmesi ile ilgilidir.
- 10 Fan Chao-ming ve arkadaşları, Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases, Cilt 34, no. 5, Mayıs 2011, sayfa 356-358 [Çince için, İngilizce için bakınız the Medline Abstract NLM21729624], Mycobacterium tuberculosis antikorları için ikili antijen sandviç kolodyal altın immüno-kromatografisi hızlı saptamaya yönelik bir
- 15 çalışma açıklar.

WO 2013/067524 (Madde 54(3) EPC uyarınca bilinen teknik ve US2013115634'ün familya üyesi), Lyme hastalığı antikorlarının saptanmasına yönelik peptitler ve yöntemler açıklar.

20

WO 2014/059274 (Madde 54(3) EPC uyarınca bilinen teknik), Ehrlichia antikorlarının saptanmasına yönelik peptitler, cihazlar ve yöntemler açıklar.

25 **BULUŞUN ÖZETİ**

Mevcut buluş kısmen saptanabilir Fc bağlanma moleküllerinin (örn., Protein A konjüгатları, Protein G konjüгатları, sekonder antikor

konjüгатları) ilavesinin, immünodeneylerde, örn., antijen-bazlı yakalama veya sandviç tipi deneylerde antikorların saptanması için kullanılabileceğinin keşfedilmesine dayanır. Bu saptanabilir Fc bağlanma molekülüleri, immünodeneylerde antikorların saptanması için 5 tek başlarına veya başka saptanabilen öğeler ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Örneğin bu Fc bağlanma molekülüleri, saptanacak antikorlar antikora spesifik bağlanma öğeleri, örn., antijenler tarafından yakalandığında antikorları saptamak için kullanılabilir. Başka bir örnekte bu Fc bağlanma molekülüleri, örn. başka bir etiketli 10 veya saptanabilen antikor bağlanma öğesi, örneğin antijen ile kombinasyon halinde, saptanabilen sinyaller için bir ikincil kaynak olarak kullanılabilir.

Bu keşif, burada tarif edilen çeşitli yakalama tipi deneylere, ilgili 15 yöntemlere, kompozisyonlara ve kitlere uygulanabilir.

Böylelikle bazı düzenekler, bir test örneği içinde bir antikoru saptanmasına yönelik, aşağıdakileri içeren yöntemler içerir: (a) test örneği bir birinci dedektör ile temas ettirilerek birinci dedektörü ve 20 antikoru içeren bir birinci kompleksin oluşturulması, buradaki birinci dedektör, bir birinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir Fc bağlanma molekülü içerir; (b) birinci kompleksin, bir yüzeyin bir test bölgesi üzerinde immobilize edilmiş bir yakalama öğesi ile temas ettirilmesi, buradaki yakalama öğesi, antikora spesifik olarak 25 bağlanabilir; ve (c) test bölgesinde birinci saptanabilen öğeden gelen bir sinyalin varlığının saptanması, burada sinyalin varlığı, test örneği içinde antikoru varlığının göstergesidir. Bazı düzeneklerde birinci dedektör, yüzeyin bir konjüгат bölgesine immobilize edilir, burada

konjüгат bölgesi, yüzeyin test bölgesi ile çakışmaz. Spesifik düzeneklerde Fc bağlanma molekülü, protein A, protein G veya her ikisidir. Bazı düzeneklerde birinci dedektör, her biri saptanabilen ögeye konjüge edilmiş protein A ve protein G içerir. Bu tür
 5 düzeneklerde protein A'nın protein G'ye oranı, saptanacak immünoglobulinin tipine bağlı olarak sinyal amplifikasyon düzeyini optimize etmek amacıyla ayarlanabilir. Örneğin bazı düzeneklerde protein A ve protein G, yaklaşık 10:1 ila yaklaşık 1:10, daha fazla tercihen yaklaşık 5:1 ila yaklaşık 1:5 oranında bulunur.

10

Bazı düzeneklerde yakalama ögesi, bir antijen veya antijenik peptittir. Özel düzeneklerde adı geçen antijen veya antijenik peptit, kalpkurdu, örn., köpekgiller kalpkurdu, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*,
 15 kedigiller lösemi virüsü, parvovirüs, influenza A suşu, influenza B suşu, kuş gribi virüsü, respiratuar sinsitiyal virüs, *Legionella*, adenovirüs, rotavirüs, kedigiller immüno-eksiklik virüsü, insan immüno-eksiklik virüsü ve Grup A *Streptococcus*'tan oluşan gruptan seçilen bir organizmadandır.

20

Bazı düzeneklerde birinci saptanabilen öge, bir metal nano-partikül, metal nano-kabuk, florofor veya renkli lateks partikülüdür. Bazı düzeneklerde metalik nano-partikül veya metalik nano-kabuk, altın partikülleri, gümüş partikülleri, bakır partikülleri, platinyum
 25 partikülleri, kadmiyum partikülleri, kompozit partikülleri, altın delik küreleri, altın kaplı silika nano-kabukları ve silika kaplı altın kabuklarından oluşan gruptan seçilir.

Burada sunulan bazı yöntemler ayrıca test örneğinin bir ikinci dedektör ile temas ettirilmesini içerir, buradaki ikinci dedektör, bir ikinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir antijen veya antijenik peptit içerir; adı geçen antijen veya antijenik peptit, antikora spesifik olarak bağlanabilir. Bazı düzeneklerde birinci ve ikinci dedektör, bir konjüгат bölgesi üzerinde immobilize edilir, buradaki konjüгат bölgesi, yüzeyin test bölgesi ile çakışmaz. Bazı düzeneklerde konjüгат bölgesi ayrıca bir kontrol dedektörü içerir. Sinyal amplifikasyon düzeyi, birinci dedektörün ikinci dedektöre oranı ayarlanarak seçilebilir. Bazı düzeneklerde birinci dedektörün ikinci dedektöre oranı, yaklaşık 20:1 ila yaklaşık 1:20, daha fazla tercihen yaklaşık 20:1 ila yaklaşık 1:1'dir.

Spesifik düzeneklerde birinci ve ikinci saptanabilen öğeler aynıdır. Daha spesifik düzeneklerde birinci ve ikinci saptanabilen öğelerin her ikisi de altın nano-partikülleridir. Diğer düzeneklerde birinci ve ikinci saptanabilen öğeler farklıdır.

Bazı düzeneklerde yüzey, bir lateral akış deneyi cihazında bir akış yolu, bir mikrotiter plakanın bir yüzeyi veya bir analitik rotorda bir akış yoludur.

Yukarıda belirtildiği gibi bazı düzeneklerde saptanabilen bir öğeye konjüge edilmiş bir ikinci dedektör kullanılır, buradaki ikinci dedektör, bir antijen veya antijenik peptittir. Bu ve ilişkili düzeneklerin bazılarında antijen veya antijenik peptit, kalpkurdu, örn., köpekgiller kalpkurdu, Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia ewingii, Borrelia burgdorferi, Borrelia afzelii, Borrelia

garinii, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, kedigiller lösemi virüsü, parvovirüs, örn. köpekgiller parvovirüs, influenza A suşu, influenza B suşu, kuş gribi virüsü, respiratuar sinsitiyal virüs, Legionella, adenovirüs, rotavirüs, kedigiller immüno-eksiklik virüsü, insan immüno-eksiklik virüsü ve Grup A Streptococcus'tan oluşan gruptan seçilen bir organizmadandır.

Bazı düzeneklerde yüzey, bir lateral akış deneyi cihazında bir akış yolu veya bir analitik rotorda bir akış yoludur. Belirli düzeneklerde test örneği, kan, serum veya plazmadır.

Ayrıca bir örnek yükleme bölgesi; bir konjüгат bölgesi, ki burada adı geçen konjüгат bölgesi, bir birinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir Fc bağlanma molekülü içeren, mobilize edilebilen bir birinci dedektör içerir; ve bir test bölgesi içeren antikor saptama cihazları da dahildir, burada adı geçen test bölgesi, antikora spesifik olarak bağlanabilen, immobilize edilmiş bir yakalama ögesi içerir: buradaki örnek yükleme bölgesi, konjüгат bölgesi ve test bölgesi, çalışma sırasında örnek yükleme bölgesine yüklendiğinde bir sıvı örnek, konjüгат bölgesi ve test bölgesi ile akışkan iletişimine geçecek şekilde konfigüre edilir. Bazı düzeneklerde Fc bağlanma molekülü, protein A ve/veya protein G'dir.

Bazı düzeneklerde yakalama ögesi, bir antijen veya antijenik peptittir. Belirli düzeneklerde antijen veya antijenik peptit, kalpkurdu, örn., köpekgiller kalpkurdu *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, kedigiller lösemi

virüsü, parvovirüs, örn. köpekgiller parvovirüs, influenza A suşu, influenza B suşu, kuş gribi virüsü, respiratuar sinsitiyal virüs, Legionella, adenovirüs, rotavirüs, kedigiller immüno-eksiklik virüsü, insan immüno-eksiklik virüsü ve Grup A Streptococcus'tan oluşan
5 gruptan seçilen bir organizmadandır.

Belirli düzeneklerde birinci saptanabilen öge, bir metal nano-partikül, metal nano-kabuk, florofor veya renkli lateks partikülüdür. Spesifik düzeneklerde metalik nano-partikül veya metalik nano-kabuk, altın
10 partikülleri, gümüş partikülleri, bakır partikülleri, platinyum partikülleri, kadmiyum partikülleri, kompozit partikülleri, altın delik küreleri, altın kaplı silika nano-kabukları ve silika kaplı altın kabuklarından oluşan gruptan seçilir.

15 Bazı düzeneklerde cihaz ayrıca örnek yükleme bölgesine yüklendiğinde bir sıvı örnek ile akışkan iletişiminde olan bir kontrol bölgesi içerir. Bazı düzeneklerde kontrol bölgesi, bir kontrol dedektörünü spesifik olarak bağlayabilen, immobilize edilmiş bir bağlanma ortağı içerir.

20

Belirli düzeneklerde birinci dedektör, bir birinci saptanabilen ögeye konjüge edilmiş protein A veya protein G içerir ve adı geçen immobilize edilmiş bağlanma ortağı, bir anti-protein A veya anti-protein G antikorudur.

25

Bazı cihazlar ayrıca test bölgesinin aşağı akışına konumlandırılmış bir absorbent ped içerir. Bazı cihazlarda konjüгат bölgesi, yükleme bölgesinin yukarı akışına konumlandırılır. Bazı düzeneklerde konjüгат

bölgesi, yükleme bölgesinin aşağı akışına konumlandırılır. Bazı düzeneklerde örnek yükleme bölgesi, bir kan separatör materyali içerir. Bazı durumlarda konjüгат bölgesi ayrıca mobilize edilebilen bir ikinci dedektör içerir, buradaki ikinci dedektör, bir ikinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir antijen veya antijenik peptit içerir; adı geçen antijen veya antijenik peptit, antikora spesifik olarak bağlanabilir. Birinci dedektörün (örn., Fc bağlanma molekülünün, örneğin bir birinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş protein A ve/veya protein G'nin) ikinci dedektöre (bir ikinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş antijen/antijenik peptite) oranı, arzu edilen sinyal amplifikasyon düzeyini seçecek şekilde ayarlanabilir. Bazı düzeneklerde birinci dedektörün ikinci dedektöre oranı, yaklaşık 20:1 ila yaklaşık 1:20'dir. Diğer düzeneklerde birinci dedektörün ikinci dedektöre oranı, yaklaşık 20:1 ila yaklaşık 1:1'dir.

15

Belirli düzeneklerde birinci ve ikinci saptanabilen öğeler aynıdır. Spesifik düzeneklerde birinci ve ikinci saptanabilen öğeler, altın nanopartikülleridir. Diğer düzeneklerde birinci ve ikinci saptanabilen öğeler farklıdır.

20

Belirli düzeneklerde, örneğin anti-mikrobiyal antikorların saptanması için antijen veya antijenik peptit, kalpkurdu, örn., köpekgiller kalpkurdu *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, kedigiller lösemi virüsü, parvovirüs, örn. köpekgiller parvovirüs, influenza A suşu, influenza B suşu, kuş gribi virüsü, respiratuar sinsitiyal virüs, *Legionella*, adenovirüs, rotavirüs, kedigiller immüno-eksiklik virüsü, insan

25

immüno-eksiklik virüsü ve Grup A Streptococcus'tan oluşan gruptan seçilen bir organizmadandır.

Ayrıca burada tarif edilen bir veya daha fazla saptama cihazını ve sistemini ve bir test örneği içinde bir antikoru saptamak için cihazın veya sistemin kullanılma talimatlarını içeren kitler de dahildir. Bazı kitler ayrıca bir ikinci dedektör ve saptama sisteminin örnek yükleme bölgesine uygulanmadan önce ikinci dedektörün test örneği ile birleştirilmesine yönelik talimatlar içerir, burada adı geçen ikinci dedektör, bir ikinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir antijen veya antijenik peptit içerir; adı geçen antijen veya antijenik peptit, antikora spesifik olarak bağlanabilir. Bazı düzeneklerde talimatlar, ikinci dedektörün test örneği ile, ikinci dedektör, arzu edilen sinyal amplifikasyon düzeyine ulaşmak için birinci dedektör ile belirli bir oranda bulanacak şekilde birleştirilmesini sağlar.

Ayrıca bir test örneği içinde bir antikorun saptanmasına yönelik, test örneğinin, burada tarif edilen bir veya daha fazla saptama cihazının veya sisteminin örnek yükleme bölgesine uygulanmasını ve birinci saptanabilen öğeden gelen bir sinyalin test bölgesi içinde varlığının veya yokluğunun saptanmasını içeren yöntemler de dahildir. Bazı yöntemler ayrıca saptama sisteminin örnek yükleme bölgesine uygulanmadan önce bir ikinci dedektörün test örneği ile birleştirilmesini içerir, burada adı geçen ikinci dedektör, bir ikinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir antijen veya antijenik peptit içerir; adı geçen antijen veya antijenik peptit, antikora spesifik olarak bağlanabilir.

Bazı düzenekler, bir yakalama ögesi, bir test örneği içinde bir antikor ve bir birinci dedektör içeren bir veya daha fazla yakalama kompleksi ile ilgilidir, buradaki yakalama ögesi, antikora bağlanır ve buradaki birinci dedektör, bir birinci saptanabilen ögeye konjüge edilmiş ve antikorun Fc bölgesine bağlanan bir Fc bağlanma molekülü içerir. Bu ve ilişkili düzeneklerin bazıları ayrıca bir ikinci dedektör içerir, buradaki ikinci dedektör, antikorun değişken bölgesine spesifik olarak bağlanır. Bazı düzeneklerde yakalama kompleksi, bir yüzeyin bir test bölgesi üzerinde immobilize edilmiştir.

10

Buluş, istemlerle tanımlanır.

ÇİZİMLERİN KISA TARİFİ

Şekil 1, bir test yüzeyine (örn., nitroselüloz) immobilize edilmiş bir yakalama ögesi (örn., BSA'ya konjüge edilmiş, antikora spesifik antijen) tarafından yakalanan, ilgi konusu bir antikor, bir hedef antikorun Fc bölgesine bağlanmış, saptanabilen bir Fc bağlanma molekülü konjüгатı (örn., Protein A veya Protein G kolodyal altın konjüгатı) ve isteğe bağlı olarak konu olan antikorun değişken bölgesine bağlanmış, bir ikinci saptanabilen konjüгат (örn., antijen-kolodyal altın konjüгатı) ile birlikte buluşa ait bir yakalama kompleksinin bir örneğini gösterir.

Şekil 2, bir lateral akış cihazının ve mevcut buluşa uygun yöntemin bir örneğini gösterir. Konu olan bir antikora spesifik antijenik peptitler, taşıyıcı protein sığır serum albüminine (BSA) bağlanır ve elde edilen BSA-peptit konjüгатları, nitroselüloz üzerinde yakalama olarak kullanılır. Bu aynı antijenik peptit ayrıca bu örnek deneyde

etiket görevi gören kolodyal altına konjüge edilir. Üretilen sinyal daha sonra ayrıca Protein A/G-altın konjüгат(lar)ı konjüгат karışımına ilave edilerek amplifiye edilir.

Şekil 3, Şekil 2’de gösterilen lateral akış cihazı kullanılarak Lyme hastalığına spesifik bir lateral akış deneyinin zamana göre örnek akışını gösterir. Bu örnek deneyde bir damla kan, serum veya plazma (yaklaşık 15-20 μ L, transfer pipeti aracılığıyla), dört damla kolodyal altın konjüгат çözeltisi (bir damlatma şişesinden yaklaşık 30 μ L), bir reaksiyon tüpü içinde karıştırılır. Elde edilen reaksiyon karışımından bir damla, yassı bir yüzey üzerine konulan test kasetinin örnek portuna aktarılır. Kan ayırma pedi, kan hücrelerini bütün kandan filtre eder (bakınız Şekil 2). Plazma (veya serum) ve B. burgdorferi antikor konjüгатı kompleksleri, test ve kontrol bölgelerini ihtiva eden nitroselüloz membrana taşınır. Üç (3) damla (bir damlatma şişesinden yaklaşık 60 μ L) takip tamponu (örnek uygulandıktan bir dakika sonra), bütün karışımı, sıvıyı çekmeye devam eden üst absorbent pede doğru nitroselüloz içinden taşır. Bir pozitif örnek içinde bulunan, B. burgdorferi’ye spesifik antikorlar hali hazırda altın etiketli antijen konjüгатı ile kompleksleşmiştir. Etiketli antijen-antikor kompleksi, immobilize edilmiş antijenin etiketli antijen-antikor komplekslerini, antikor üzerindeki ikinci bağlanma sahası aracılığıyla yakaladığı test çizgisine gider. Konjüгат karışım içinde bulunan protein A/G-altın konjüгатı, hedef antikorun Fc bölgesine bağlanır ve test sinyalini amplifiye eder. Serbest etiketli antijen ve reaksiyon karışımının geri kalanı, Protein A altın konjüгатının, bir tavuk anti-Protein A antikor içeren kontrol yakalaması tarafından yakalandığı kontrol çizgisine geçer. Bu durumda cihaz, yaklaşık 8 dakikada okunur. Test bölgesinde kırmızı bir çizginin görünmesi ve kontrol bölgesinde bir ikinci kırmızı

çizginin görünmesi, B. burgdorferi'ye yönelik antikorların varlığını gösterir. Sadece kontrol bölgesinde bir kırmızı çizginin görünmesi, B. burgdorferi'ye yönelik antikorların olmadığını gösterir. (a) Test çizgisi görünür ancak kontrol çizgisi oluşmazsa veya (b) ne kontrol ne de test çizgisi oluşursa test geçersiz kabul edilir.

DETAYLI TARİFNAME

Burada kullanılan aşağıdaki terimler, aşağıdaki anlamlara sahip olacaktır:

"Bir" sıfatı burada maddenin dilbilgisel objesinden birine veya birden fazlasına (yani en az birine) karşılık gelecek şekilde kullanılır. Örnek olarak "bir eleman", bir eleman veya birden fazla eleman anlamına gelir.

"Yaklaşık" ile, bir referans miktar, düzey, değer, sayı, frekans, yüzde, boyut, ebat, miktar, ağırlık veya uzunluğa göre %30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 veya 1 kadar değişiklik gösteren bir miktar, düzey, değer, sayı, frekans, yüzde, boyut, ebat, miktar, ağırlık veya uzunluk kast edilmektedir.

Bu spesifikasyon boyunca içerik aksini gerektirmediği sürece "içerme", "içerir" ve "içeren" gibi sözcüklerin, belirtilen bir adımın veya ögenin veya adım veya öge grubunun dahil olduğunu, ancak başka herhangi bir adımın veya ögenin veya adım veya öge grubunun hariç olmadığını gösterecek şekilde anlaşılacaktır.

"..'den oluşur" ile, "..'den oluşur" ifadesini takip edenin içerildiği, ve

bununla sınırlı olduğu kast edilmektedir. Böylelikle "...den oluşur" ifadesi, sayılan öğelerin gerekli veya zorunlu olduğunu ve başka öğelerin bulunamayacağını gösterir. "Esasen ...'den oluşur" ifadesi ile, ifadeden sonra sayılan öğelerin dahil olduğu ve sayılan öğeler için

5 açıklamada belirtilen aktiviteye veya etkiye müdahale etmeyen veya katkıda bulunmayan diğer öğeler ile sınırlı olduğu kast edilmektedir. Böylelikle "esasen ...'den oluşur" ifadesi, sayılan öğelerin gerekli veya zorunlu olduğunu, ancak diğer öğelerin isteğe bağlı olduğunu ve sayılan öğelerin aktivitesini veya etkisini somut şekilde etkileyip

10 etkilemediklerine bağlı olarak bulunabileceklerini veya bulunamayacaklarını gösterir

"Peptit" ve "polipeptit" ve "protein" terimleri burada birbirlerine yerine, amino asit tortularının bir polimerine ve bunların varyantlarına

15 ve sentetik ve doğal yoldan meydana gelen analoglarına karşılık kullanılır. Böylelikle bu terimler, bir veya daha fazla amino asit tortusunun sentetik, doğal olmayan yoldan meydana gelen amino asitler, örneğin karşılık gelen, doğal yoldan meydana gelen bir amino asidin kimyasal bir analogunun yanı sıra doğal yoldan meydana gelen

20 amino asit polimerleri ve bunların doğal yoldan meydana gelen kimyasal türevleri olduğu amino asit polimerleri için geçerlidir.

Bir "artmış" veya "güçlenmiş" miktar isteğe bağlı olarak "istatistiksel açıdan anlamlı" bir miktardır ve örneğin saptanabilen bir Fc bağlanma

25 molekülü olmadan yapılan bir antikor testine göre miktarın veya değerin (örn., sinyalin veya değerin, örneğin bir Reaktivite skorunun) yaklaşık 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 veya daha fazla katı (bunların arasındaki ve 1'in

üzerindeki tüm tamsayılar, aralıklar ve ondalık basamaklar, örn., 2.5, 3.6, 3.7. 3.8, vb. dahil olmak üzere) olan bir artışı içerebilir. Bir "artmış" veya "güçlenmiş" değer veya miktar ayrıca örneğin saptanabilen bir Fc bağlanma molekülü olmadan yapılan bir antikör testine göre miktarda veya değerinde %1, %2, %3, %4, %5, %6, %7, %8, %9, %10, %11, %12, %13, %14, %15, %16, %17, %18, %19, %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55, %60, %65, %70, %75, %80, %85, %90, %95, %100, %200, %300, %400, %500'lük veya daha fazla bir artış içerebilir.

10

Yöntemler

Bir yönde mevcut buluş, bir test örneği içinde bir antikörün saptanmasına yönelik yöntemler içerir. Bazı düzeneklerde bu yöntemler, ilgili kısmında, test örneğinin bir birinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir Fc bağlanma molekülü (yani saptanabilen bir Fc bağlanma molekülü konjüгатı) ile temas ettirilerek bir birinci kompleks oluşturulması, birinci kompleksin bir yüzeyin bir test bölgesi üzerinde immobilize edilmiş bir yakalama ögesi ile temas ettirilmesi, ki burada yakalama ögesi, antikora spesifik olarak bağlanabilir ve saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатından gelen bir sinyalin test bölgesi içindeki varlığının saptanması ile ilgilidir. Burada sinyalin varlığı, antikörün test örneği içindeki varlığının göstergesidir.

25

Bu yöntemlerin reaktanları herhangi bir sırada veya ardışıklıkta temas ettirilebilir. Örneğin test örneği, yüzeye uygulanmadan önce saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатı ile karıştırılabilir veya

bu iki reaktan, yüzeye ayrı ayrı, sırayla veya aynı anda, yüzey üzerindeki aynı veya farklı bir yere uygulanabilir. Ayrı ayrı ilave edildiğinde reaktanlar, test yüzeyine yayılırken veya bunun içinden akarken, kılcal veya başka bir hareket yoluyla birbirleri ile temas edecektir. Belirli düzeneklerde saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатı, yüzeyin test bölgesi ile çakışmayan, yüzeyin bir konjüгат bölgesine önceden immobilize edilir. Bu düzeneklerin bazılarında test örneği, yüzeye uygulanabilir, burada kılcal veya başka bir hareket yoluyla konjüгат bölgesi ve test bölgesi içinden akar ve bu şekilde Fc bağlanma molekülü ve yakalama ögesi ile temas eder. Örnek içinde konu olan bir antikor varsa bu, saptanabilen Fc bağlanma molekülü ve yakalama ögesi ile saptanabilen bir kompleks oluşturacaktır. Spesifik düzeneklerde Fc bağlanma molekülü; protein A, protein G, protein A/G, protein L veya bunların herhangi bir kombinasyonu, örn., bunların bir karışımı veya bir füzyon proteinidir.

Burada sağlanan bazı yöntemler ayrıca test örneğinin bir ikinci dedektör molekül ile temas ettirilmesini içerir. Bu düzeneklerde ikinci dedektör, uygun herhangi bir antikor bağlanma ögesi, örn. bir ikinci saptanabilen ögeye konjüğe edilmiş ve antikora spesifik olarak bağlanabilen bir antijen veya antijenik peptit olabilir. Kombinasyon, örn. ikinci dedektör ile ikinci saptanabilen ögenin konjüгатı bazen "saptanabilen antikora spesifik antijen konjüгатı" veya "saptanabilen antijen konjüгатı" olarak adlandırılır ve peptit antijenleri ve peptit harici antijenler içerir. Bazı düzeneklerde birinci ve ikinci saptanabilen ögeler aynıdır, yani Fc bağlanma molekülü konjüгатı ve the saptanabilen antijen konjüгатı, aynı tipte saptanabilen ögeye, örneğin bir altın partikülüne konjüğe edilir. Diğer düzeneklerde birinci

ve ikinci saptanabilen ögeler farklıdır. Spesifik düzeneklerde birinci ve ikinci saptanabilen ögelerin her ikisi de kolodyal altın konjüгатları (CGC) yaratmak üzere altın nano-partikülleridir. Bu ve ilişkili düzeneklerde saptanabilen Fc bağlanma molekülü, bir "Fc bağlanma molekülü-CGC" olarak adlandırılabilir; spesifik örnekler arasında Protein A-CGC'ler, Protein G-CGC'ler, protein A/G-CGC'ler ve protein L-CGC'ler bulunur. Bazı düzeneklerde Fc bağlanma molekülü, test örneği içindeki antikorun Fc bölgesine bağlanabilen bir ikincil antikor veya bunun bir fragmanı iken ikinci dedektör, uygun herhangi bir antikor bağlanma ögesi, örn. antijen veya antijenik peptit, vb. olabilir.

Yukarıdakine benzer şekilde bu yöntemlerde reaktanlar, herhangi bir sırada veya ardışıklıkta temas ettirilebilir. Bir örnek olarak test örneği, yüzeye uygulanmadan önce saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатı, saptanabilen antijen konjüгатı veya her ikisi ile karıştırılabilir veya bu üç reaktan, yüzeye ayrı ayrı, sırayla veya aynı anda, yüzey üzerindeki aynı veya farklı bir yere uygulanabilir. Ayrı ayrı ilave edildiğinde reaktanlar, test yüzeyine yayılırken veya bunun içinden akarken, kılcal veya başka bir hareket yoluyla birbirleri ile temas edecektir.

Bazı düzeneklerde Fc bağlanma molekülü konjüгатı, yüzeyin test bölgesi ile çakışmayan, yüzeyin bir konjüгат bölgesine immobilize edilir ve test örneği ve saptanabilen antijen konjüгатı, yüzeye ayrı ayrı veya birlikte uygulanır. Diğer düzeneklerde saptanabilen antijen konjüгатı, yüzeyin test bölgesi ile çakışmayan, yüzeyin bir konjüгат bölgesine immobilize edilir ve test örneği ve saptanabilen Fc

bağlanma molekülü konjüгатı, yüzeye ayrı ayrı veya birlikte uygulanır. Bazı düzeneklerde saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатı ve saptanabilen antijen konjüгатının her ikisi, yüzeyin test bölgesi ile çakışmayan, yüzeyin bir konjüгат bölgesine immobilize edilir ve test örneği, test yüzeyine uygulanır. Yüzeye uygulandıktan sonra test örneği (tek başına veya diğer reaktan ile kombinasyon halinde), konjüгат bölgesi (varsa) ve test bölgesinden geçerek kılcal veya başka bir hareket yoluyla yüzey boyunca akabilir veya yayılabilir ve bu şekilde saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатı, saptanabilen antijen konjüгатı ve yakalama öğesi ile temas edebilir. Örnek içinde konu olan bir antikor varsa bu, bu reaktanlar ile bir veya daha fazla saptanabilen kompleks oluşturacaktır ve bu şekilde antikoron örnek içindeki varlığı gösterilir. Teknikte uzman kişiler, bu örnek kombinasyonların sınırlayıcı olmadığını ve diğer olasılıkların da mümkün olduğunu takdir edeceklerdir.

Bazı düzeneklerde konjüгат bölgesi ayrıca bir kontrol dedektörü, örneğin Fc bağlanma molekülüne spesifik olarak bağlanan bir antikor içerir. Kontrol bölgelerinin başka tipleri de teknikte uzman kişiler için açık olacaktır.

Bir test örneği genellikle konu olan bir antikora, örneğin bir enfeksiyöz ajan için spesifik bir antikora sahip olan veya sahip olduğundan şüphelenilen bir süjeden elde edilmiş biyolojik bir örnektir. Tercihen bir biyolojik örneğin elde edilmesi kolaydır ve bunlar arasında bir venöz kan örneğinden veya hatta bir parmak deliğinden alınmış kan, serum veya plazma bulunabilir. Diğer vücut kısımlarından alınan dokuların veya diğer vücut sıvılarının, örneğin

serebro-spinal sıvı (CSF), tükürük, mide sekresyonları, mukus, idrar, dışkı, vb.nin antikorlar ihtiva ettiği bilinir ve bir test örneği kaynağı olarak kullanılabilir. Diğer düzeneklerde örnek, bir doku (örn., bir doku homojenatı), bir vücut organından özüt veya bir hücre lizatıdır.

5 Bazı düzeneklerde süje, bir yabancı hayvandır (örn., bir geyik veya kemirgen, örneğin bir fare, çizgili sincap, sincap, vb.). Diğer düzeneklerde süje, bir laboratuvar hayvanıdır (örn., bir fare, sıçan, kobay, tavşan, maymun, primat, vb.). Diğer düzeneklerde süje, evcil veya vahşi bir hayvandır (örn., bir köpek, bir kedi, bir at). Yine diğer

10 düzeneklerde süje, bir insandır.

Ayrıca bir immünoglobulin olarak adlandırılan bir antikor, immün sistemin Y şeklindeki bir proteini olup yabancı objeleri veya antijenleri, örneğin bakterilerin, mayaların, parazitlerin ve virüslerin

15 bileşenlerini spesifik olarak tanımlar. Bir antikorun 'Y'sinin her ucu, bir antijen üzerindeki belirli bir epitop için spesifik olan bir antijen bağlanma sahası ihtiva eder, bu şekilde bu iki yapının hassas bir şekilde birbirlerini bağlaması sağlanır. Belirli bir antikorun üretimi, bu antikor ile spesifik olarak etkileşime giren bir antijene (örn. bir

20 mikrobiyal antijene) maruz kalındığında artar. Böylelikle antijene spesifik antikorların bir süjeden alınan bir örnek içinde saptanması, süjenin konu olan mikroba, örneğin bir virüse, bakteriye, mantara veya parazite hali hazırda mı yoksa geçmişte mi maruz kaldığına dair bilgi verebilir.

25

Fragman kristalleşme bölgesi (Fc bölgesi), bir antikorun, hücre yüzeyi Fc reseptörleri ve komplement sistemin bazı proteinleri ile etkileşime giren kuyruk bölgesidir. IgG, IgA ve IgD antikor izotiplerinde Fc

bölgesi, antikorun iki ağır zincirinin ikinci ve üçüncü sabit alanlarından türetilen iki özdeş protein fragmanından oluşur. IgM ve IgE Fc bölgeleri, her polipeptit zincirinde üç ağır zincir sabit alanı (C_H alanları 2-4) ihtiva eder. IgG antikorlarının Fc bölgeleri, yüksek oranda konserve edilen bir N-glikosilasyon sahası taşır. Bu sahaya eklenen N-glikanlar baskın şekilde kompleks tipi, göbeği fukosile edilmiş, iki antenli yapılardır. Ek olarak bu N-glikanların az miktarları ayrıca ikiye bölen GlcNAc ve α -2,6 bağlı sialik asit tortuları taşır. Bir antikorun Fab bölgesi, antikorun hedef spesifikliğini tanımlayan değişken kısımlar ihtiva eder ve buna karşılık bir sınıftaki tüm antikorların Fc bölgesi, her tür için aynıdır; bunlar değişken olmaktan çok sabittir.

Bir antikorun "antijen-bağlanma sahası" veya "bağlanma kısmı", immünoglobulin molekülünün antijen bağlanmasına yer alan kısmına karşılık gelir. Antijen bağlanma sahası, ağır ("H") ve hafif ("L") zincirlerin N-terminal değişken ("V") bölgelerinin amino asit tortularından oluşur. Ağır ve hafif zincirlerin V bölgeleri içinde bulunan yüksek oranda farklı üç grup, "hiperdeğişken bölgeler" olarak adlandırılır ve "çerçeve bölgeleri" veya "FR'ler" olarak bilinen, daha fazla konserve edilmiş kuşatıcı gruplar arasına yerleşmiştir. Bu nedenle "FR" terimi, immünoglobulinlerde doğal şekilde hiperdeğişken bölgeler arasında ve bunlara komşu bulunan amino asit sekanslarına karşılık gelir. Bir antikor molekülünde bir hafif zincirin üç hiperdeğişken bölgesi ve bir ağır zincirin üç hiperdeğişken bölgesi, üç boyutlu uzayda birbirlerine göre konumlanarak bir antijen bağlanma yüzeyi oluşturur. Antijen bağlanma yüzeyi, bağlı bir antijenin üç boyutlu yüzeyine komplementerdir ve ağır ve hafif

zincirlerin her birinin üç hiperdeğişken bölgesi, "komplementerlik belirleyici bölgeler" veya "CDR'ler" olarak adlandırılır.

Bir antikor tipik olarak bir Fc bağlanma molekülü tarafından saptanmayı kolaylaştırmak için bir Fc bölgesinin tamamını veya bir kısmını içerir ve ayrıca bir antikora spesifik bağlanma ajanı, örneğin bir antijen veya antijenik peptit tarafından saptanmayı kolaylaştırmak için bir veya daha fazla antijen-bağlanma sahası içerebilir. Antikorlar örn., IgG, IgE, IgD, IgM veya IgA tipi olabilir. Genel olarak IgM ve/veya IgA antikorları örn., enfeksiyonun erken aşamalarında saptama için saptanır.

Bir Fc bağlanma molekülü, bir antikorun Fc bölgesine veya bir antikorun değişken bölgesinin dışında bulunan bir bölgeye spesifik olarak bağlanan bir bağlanma ajanı içerir. Bazı düzeneklerde bir Fc bağlanma molekülü, bir antikor veya bunun antijen bağlanma fragmanı değildir. Diğer düzeneklerde Fc bağlanma molekülü, Fc'ye spesifik bir ikincil antikor, örn. bir tavşan anti-köpek antikoru, bir keçi anti-köpek antikordur. Bazı düzeneklerde bir Fc bağlanma molekülü, bir test örneği içinde saptanacak antikora yönelik bir ikincil antikordur. Fc bağlanma moleküllerinin genel örnekleri arasında bir immünoglobulinin Fc bölgesine spesifik olarak bağlanan polipeptitler, çözülebilen reseptörler, adnektinler, küçük peptitler, peptit mimetikleri, küçük moleküller, aptamerler, vb. bulunur. Fc bağlanma moleküllerinin spesifik örnekleri arasında Protein A, Protein G, Protein A/G füzyon proteinleri, Protein L ve bunların, bir antikorun Fc bölgesine spesifik olarak bağlanma yeterliliğini muhafaza eden fragmanları ve varyantları bulunur.

Protein A, *Staphylococcus aureus* hücre çeperinde bulunan ve spa geni tarafından şifrelenen, 40-60 kDa'lık bir MSCRAMM (yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri) yüzey proteindir. Vahşi tip Protein A, üç helis demeti halinde katlanan ve bir antikoru

5 Fc bölgelerine ayrı ayrı bağlanabilen beş homolog Ig bağlanma alanından oluşur. Protein A, insan IgG1 ve IgG2'ye yüksek afinite ile ve insan IgM, IgA ve IgE'ye orta afinite ile bağlanır.

Protein G, grup C ve G Streptokok bakterilerde eksprese edilen bir

10 immünoglobulin bağlanma proteindir (bakınız örn., Sjöbring ve arkadaşları, J Biol Chem. 266: 399-405, 1991). Protein G'nin NMR çözeltisi yapısı (bakınız Lian ve arkadaşları, Journal of Mol. Biol. 228:1219-1234, 1992) ve kristal yapısı (bakınız Derrick ve Wigley, Journal of Mol. Biol. 243:906-918, 1994) 1 Angstrom'a kadar

15 çözümlenmiştir. Protein A ve Protein G, teknikte iyi bilinir ve çeşitli konjüge edilmiş ve edilmemiş formlarda ticari olarak temin edilebilir.

Protein A ve Protein G'nin tam uzunlukta veya vahşi tip versiyonlarının fonksiyonel varyantları ve fragmanları da dahildir.

20 Bazı düzeneklerde bir varyant polipeptit, Protein A ve/veya Protein G'nin vahşi tip sekansına en az yaklaşık %50, %55, %60, %65, %70, %75, %80, %85, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya daha fazla sekans özdeşliğine veya benzerliğine sahip bir amino asit sekansı içerir. Bir fonksiyonel fragman, vahşi tip Protein A

25 ve/veya Protein G'nin, örneğin 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 450, 500 veya

daha fazla bitişik veya bitişik olmayan tortusu olan bir polipeptit fragmanı olabilir. Protein A ve Protein G'nin varyantları ve fragmanları tipik olarak bir veya daha fazla immünoglobulin izotipinin Fc bölgesi için spesifik bağlanmayı muhafaza eder.

5

- Sekans özdeşliği yüzdesi, teknikte bilinen bir anlama sahiptir ve iki polipeptit veya polinükleotit sekansı arasındaki özdeşliği ölçmenin bir dizi yöntemi mevcuttur. Bakınız örn., Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988);
- 10 Smith, Ed., Biocomputing: Informatics And Genome Projects , Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); ve Gribskov & Devereux, Eds., Sequence
- 15 Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991). Polinükleotitleri veya polipeptitleri hizalamaya yönelik yöntemler, GCG program paketi (Devereux ve arkadaşları, Nuc. Acids Res. 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul ve arkadaşları, J Molec. Biol. 215:403 (1990)), ve Smith ve Waterman'ın lokal
- 20 homoloji algoritmasını (Adv. App. Math., 2:482-489 (1981)) kullanan Bestfit programı (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) dahil bilgisayar programlarında kodlanmıştır. Örneğin FASTA algoritmasını kullanan ALIGN
- 25 bilgisayar programı, -12 boşluk açma cezası ve -2 boşluk uzatma cezası ile bir affine boşluk araması ile kullanılabilir.

Fc bağlanma polipeptitlerini içeren füzyon proteinleri de, Protein A

füzyonları ve Protein G füzyonları dahil olmak üzere kapsam dahilindedir. Fc bağlanma molekülleri, başka bir Fc bağlanma molekülünün tamamına veya bir kısmına veya bir veya daha fazla heterolog polipeptite füzyonla birleştirilebilir. Bir Protein A/G füzyon proteininin spesifik bir örneği, Protein A'dan dört Fc bağlanma alanını Protein G'den iki alan ile birleştirir (bakınız örn., Sikkema, J.W.D., Amer. Biotech. Lab, 7:42, 1989; ve Eliasson ve arkadaşları, J. Biol. Chem. 263, 4323-4327, 1988); bununla birlikte diğer kombinasyonlar da kullanılabilir. Füzyon ortakları (örn., bir peptit veya başka yarım), polipeptitin bir konakçı hücrede saflaştırılmasını geliştirmek, çözünürlüğünü geliştirmek, ekspresyonunu güçlendirmek, polipeptitin saptanmasını yardımcı olmak ve bunu stabilize etmek, vb. amaçlarla kullanılabilir. Füzyon ortaklarının örnekleri arasında taşıyıcı proteinler (örn., serum albümini, örneğin sığır serum albümini), beta-galaktosidaz, glutatyon-S-transferaz, histidin takı(lar)ı, vb. bulunur.

Bir yakalama ögesi, burada tarif edilen yöntemler ve cihazlar ile saptanacak konu olan bir antikora, yani bir hedef antikora, örneğin mikroba spesifik bir antikora spesifik olarak bağlanan herhangi bir bağlanma ajanı olabilir. Tipik olarak yakalama ögesi, bir antikorun değişken bölgesine spesifik olarak bağlanır ve böylelikle bir antikorun antijen bağlanma sahası(ları) için spesifik olan bir veya daha fazla epitop ihtiva eder. Bazı düzeneklerde bir yakalama ögesi, bir antikor veya bunun bir antijen bağlanma fragmanı değildir. Belirli düzeneklerde bir yakalama ögesi, konu olan bir antikora spesifik olarak bağlanan bir antijen veya bir antijenik peptittir. Örnek antijenler ve antijenik peptitler aşağıda tarif edilmiştir. Ayrıca konu olan bir antikora, yani burada sunulan yöntemlere göre saptanacak bir

antikora spesifik olarak bağlanan, çözülebilen reseptörler, adnektinler, peptit mimetikleri, küçük moleküller, aptamerler, vb. de dahildir.

Yukarıda belirtildiği gibi bir yakalama ögesi genellikle bir test
 5 yüzeyine veya substrata, örneğin bir katı veya yarı katı desteğe eklenir
 veya bunların üzerine immobilize edilir. Ekleme, kovalent olabilir
 veya olmayabilir ve kovalent veya kovalent olmayan bağlanmayı
 sağlayan, yakalama ögesi ile birleştirilmiş bir yarım, örneğin
 taşıyıcıya, desteğe veya yüzeye eklenmiş bir bileşene yüksek bir
 10 afiniteye sahip bir yarım tarafından sağlanabilir. Örneğin bir yakalama
 ögesi, biyotin gibi bir ligand ile birleştirilebilir ve yüzey ile
 birleştirilen bileşen, karşılık gelen bir ligand reseptörü, örneğin avidin
 olabilir. Alternatif olarak bir yakalama ögesi, avidin gibi bir ligand
 reseptörü ile birleştirilebilir ve yüzey ile birleştirilen bileşen, karşılık
 15 gelen bir ligand, örneğin biyotin olabilir. Yakalama ögesi, bir
 immünodeney sırasında antikoru ihtiva eden bir örneğin ilave
 edilmesinden önce veya sonra test yüzeyine veya substrata eklenebilir
 veya bunların üzerinde immobilize edilebilir.

20 Belirli düzeneklerde test yüzeyi, bir lateral akış deneyi cihazında bir
 tane, bir nokta blotu, bir akış yolu veya bir analitik rotorda bir akış
 yoludur. Örneğin yakalama ögesi, gözenekli bir membran, örneğin bir
 PVDF membranı (örn., bir Immobilon™ membranı), bir nitroselüloz
 membran, polietilen membran, naylon membran veya benzer tipte bir
 25 membrana eklenebilir veya bunların üzerinde veya immobilize
 edilebilir. Diğer düzeneklerde test yüzeyi veya substrat, bir tüp veya
 bir oyuk, örneğin bir ELISA veya başka sandviç tipi deneyde
 kullanılmaya uygun bir plakadaki (örn., bir mikrotiter plakadaki) bir

oyuktur. Bazı düzeneklerde test yüzeyi veya substrat, bir sensör, örneğin elektrokimyasal, optik veya opto-elektronik sensördür.

Bu tür test yüzeyleri veya substratlar, cam, selüloz bazlı materyaller, termoplastik polimerler örneğin polietilen, polipropilen veya polyester, partikülat materyallerden oluşan sinterli yapılar (örn., cam veya çeşitli termoplastik polimerler) veya nitroselüloz, naylon, polisülfon veya benzerlerinden oluşan döküm membran film içerebilir. Bir test yüzeyi veya substrat, yaygın şekilde gözenekli polietilen olarak bilinen, sinterlenmiş, ince polietilen partikülleri, örneğin Chromex Corporation'dan (Albuquerque, NM) 0.2-15 mikronluk gözenekli polietilen, Porex™, vb. olabilir. Bu test yüzeyi veya substrat materyallerinin tamamı, filmler, levhalar veya plakalar gibi uygun biçimlerde kullanılabilir veya uygun eylemsiz taşıyıcılar, örneğin kağıt, cam, plastik filmler veya kumaşlar üzerine kaplanabilir veya bunlara bağlanabilir veya lamine edilebilir.

Peptitler gibi yakalama öğelerinin katı fazlar üzerine immobilize edilmesi için uygun yöntemler arasında iyonik, hidrofobik, kovalent etkileşimler ve benzeri bulunur. Bir katı veya yarı katı taşıyıcıya, desteğe veya yüzeye spesifik veya yarı spesifik bağlanma, yakalama öğesinin bununla birleştirilmiş olarak, katı veya yarı katı taşıyıcıya, desteğe veya yüzeye bunun kovalent veya kovalent olmayan şekilde bağlanmasını sağlayan bir yarıma sahip olması ile sağlanabilir. Örneğin yarı, taşıyıcıya, desteğe veya yüzeye eklenmiş bir bileşene karşı afiniteye sahip olabilir. Bu durumda yarı, peptitin bir amino asit grubuna, örneğin 6-aminoheksanoik aside bağlanmış örn. bir biyotin veya biyotinil grubu veya bunların bir analogu olabilir ve

bileşen ise avidin, streptavidin, nötravidin veya bunların bir analogudur. Bir alternatif, yarımın altı ardışık histidin tortusundan (örn., 6x-His takısı) oluşan bir amino asit sekansına sahip olduğu ve taşıyıcının, Ni^{++} veya Co^{++} iyonları ile yüklü bir Nitrilotriasetik Asit (NTA) türevi içerdiği bir durumdur. Yukarıdakilere ek olarak uygun taşıyıcılar, destekler ve yüzeyler arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte taneler (örn., manyetik taneler, kolodyal partiküller veya nano-partiküller, örneğin kolodyal altın veya silika, lateks, polistiren, polikarbonat veya PDVF içeren nano-partiküller), kopolimerlerin lateksi örneğin stiren-divinil benzen, hidroksile stiren-divinil benzen, polistiren, karboksile polistiren, siyah karbon taneleri, aktifleştirilmemiş veya polistiren veya polivinil klorid ile aktifleştirilmiş cam, epoksi ile aktifleştirilmiş gözenekli manyetik cam, jelatin veya polisakarit partikülleri veya başka protein partikülleri bulunur.

Yukarıda belirtildiği gibi antijenler ve antijenik peptitler, yakalama öğeleri olarak ve/veya antikora spesifik dedektörler olarak kullanılabilir. Seçilen bir antijen veya antijenik peptit, en sık şekilde antikorun antijen bağlanma sahalarından biri veya her ikisi aracılığıyla bir hedef antikora spesifik olarak bağlanabilir. Böylelikle burada kullanıldığı gibi "antijen" terimi, antikorun en az bir antijen bağlanma sahası aracılığıyla bir antikor tarafından spesifik olarak bağlanabilen bir moleküle karşılık gelir. Bir antijen, bir veya daha fazla epitop, yani antijenin, antikorun antijen bağlanma sahasına spesifik olarak bağlanan, belirli, bitişik veya bitişik olmayan bölge(ler)ini içerebilir. Bir epitop; bir lineer epitop, sıralı epitop veya konformasyonel bir epitop olabilir.

Bir antijen örneğin bir peptit veya bunun modifiye edilmiş bir formu veya peptit harici bir antijen, örneğin bir küçük molekül olabilir. Yukarıda belirtildiği gibi antijenler ayrıca konu olan bir antikora spesifik olarak bağlanan çözülebilen reseptörler, adnektinler, peptit
5 mimetikleri, küçük moleküller, aptamerler, vb. içerebilir.

Yakalama öğeleri veya "yakalama antijenleri" olarak kullanıldığında antijenler veya antijenik peptitler genellikle etiketsizdir ve bir test yüzeyine immobilize edilmiş veya başka şekilde eklenmiştir. Bazı
10 düzenekler için yakalama antijenleri, test yüzeyine eklenmeyi kolaylaştırmak veya başka bir amaçla bir veya daha fazla heterolog proteine, örneğin sığır serum albüminine veya çoklu antijen peptitlerine (MAPS) füzyonla birleştirilebilir veya konjüge edilebilir veya bunlarla kompleksleştirilebilir.

15

Antikora spesifik dedektörler olarak kullanım için antijenler veya antijenik peptitler genellikle saptanabilen bir öğeye konjüge edilir ve bu şekilde bir "saptanabilen antijen konjüгатı" oluşturulur. Bazı düzeneklerde bu saptanabilen antijen konjüгатları ayrıca bir veya daha
20 fazla heterolog proteine, örneğin sığır serum albüminine veya MAPS'ye füzyonla birleştirilir veya konjüge edilir veya bunlarla kompleksleştirilir. Saptanabilen antijen konjüгатları, aşağıda tarif edildiği gibi direkt veya dolaylı saptama için tasarlanabilir.

25 Antijenik peptitler içeren füzyon proteinleri de öngörülür. Antijenik peptitler, aynı veya farklı bağlanma spesifikliğine sahip (örn., bir veya daha fazla aynı veya farklı epitopa sahip) bir veya daha fazla antijenik peptitin tamamına veya bir kısmına veya bir veya daha fazla heterolog

- polipeptite füzyonla birleştirilebilir. Füzyon ortakları (örn., bir peptit veya başka yarım), peptitin bir konakçı hücrede saflaştırılmasını geliştirmek, çözünürlüğünü geliştirmek, ekspresyonunu güçlendirmek, antijenik peptitin saptanmasını yardımcı olmak, bunu stabilize etmek, bir test yüzeyi üzerine immobilizasyonunu kolaylaştırmak vb. amaçlarla kullanılabilir. Füzyon ortaklarının örnekleri arasında taşıyıcı proteinler (örn., serum albümini, örneğin sığır serum albümini), beta-galaktosidaz, glutatyon-S-transferaz, histidin takı(lar)ı, vb. bulunur.
- 10 Antijenler ve antijenik peptitler ve diğer antikora spesifik bağlanma ajanları, çeşitli kaynaklardan türetilir. Belirli düzenekler, virüsler, bakteriler, mantarlar ve parazitler dahil mikrobiyal kaynaklardan türetilenleri içerir. Spesifik örnekler arasında kalpkurdu, örn., köpekgiller kalpkurdu, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia*
- 15 *afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, kedigiller lösemi virüsü, parvovirüs, örn. köpekgiller parvovirüs, influenza A suşu, influenza B suşu, kuş gribi virüsü, respiratuar sinsitiyal virüs, insan immüno-eksiklik virüsü (HIV), *Legionella*, adenovirüs, Grup A *Streptococcus*, kedigiller immüno-eksiklik virüsü (FIV), rotavirüs
- 20 vb.'den birinden veya daha fazlasından gelen antijenler bulunur. Lyme hastalığı antikorlarının saptanmasına yönelik *Borrelia* antijenlerinin örnekleri, US2013115634, ABD Patent Yayını No. US 2011/0136155, ve WO 2011/063003'te bulunabilir. *Ehrlichia* antikorlarının saptanmasına yönelik *Ehrlichia* antijenlerinin örnekleri, ABD Patent
- 25 Yayını No. 2011/0124125, ve WO2011/063235'te bulunabilir.

Burada tarif edilen yöntemlere göre kullanılmaya yönelik antijenik peptitler, sentetik kimya yoluyla hazırlanabilir (yani, bir "sentetik

peptit"). Diğer düzeneklerde antijenik peptitler, biyolojik olarak (yani, bir ribozom gibi hücre mekanizması ile) üretilebilir. Bazı düzeneklerde antijenik peptitler izole edilir. Burada kullanıldığı gibi "izole edilmiş" bir peptit, sentetik veya biyolojik olarak üretilmiş ve sonra peptiti üretmek için kullanılan kimyasallardan ve/veya hücre mekanizmasından en azından kısmen saflaştırılmış bir peptittir. Bazı düzeneklerde izole edilmiş bir peptit, önemli ölçüde saflaştırılmıştır. Burada kullanıldığı gibi "önemli ölçüde saflaştırılmış" terimi, peptitin sentezinde kullanılan hücre materyallerini (proteinleri, lipitleri, karbohidratları, nükleik asitleri, vb.), kültür ortamını, kimyasal öncülleri, kimyasalları veya bunların kombinasyonlarını önemli ölçüde içermeyen bir moleküle, örneğin bir peptite karşılık gelir. Önemli ölçüde saflaştırılmış bir peptit, yaklaşık %40, %30, %25, %20, %15, %10, %5, %2, %1'den az veya daha az, peptit sentezinde kullanılan hücre materyaline, kültür ortamına, başka polipeptitlere, kimyasal öncülere ve/veya kimyasallara sahiptir. Buna göre önemli ölçüde saf bir molekül, örneğin bir peptit, kuru ağırlık olarak en az yaklaşık %60, %70, %75, %80, %85, %90, %95, %98 veya %99 konu olan molekül olabilir. İzole edilmiş bir peptit, su, bir tampon içinde veya örn., bir kitin parçası olarak yeniden oluşturulmayı bekleyen kuru formda olabilir. İzole edilmiş bir peptit, farmasötik açıdan kabul edilebilir bir tuz formunda olabilir. Adı geçen peptitler ile tuzlar oluşturabilen uygun asitler ve bazlar, teknikte uzman kişilerce iyi bilinir ve bunlar arasında inorganik ve organik asitler ve bazlar bulunur.

25

Konu olan bir antikor veya bunun antijen bağlanma fragmanı, öge veya dedektör ile saptanabilen düzeyde (örneğin bir lateral akış deneyinde, western blot veya ELISA deneyinde) reaksiyona girer ve

benzer koşullar altında alakasız polipeptitler veya ajanlar ile istatistiksel açıdan anlamlı şekilde saptanabilen düzeyde reaksiyona girmezse bunun, bir yakalama ögesine veya antikora spesifik dedektöre (örn., antijen veya antijenik peptite) “spesifik olarak bağlandığı”, “immünolojik olarak bağlandığı” ve/veya bununla “immünolojik olarak reaktif” olduğu söylenir. "Spesifik olarak bağlanma" terimi ayıca bir yakalama ögesinin veya antikora spesifik dedektörün, konu olan antikor için, bir örnek içindeki diğer antikorlardan daha yüksek afiniteye (örn., daha yüksek derecede seçiciliğe) sahip olması anlamına gelebilir.

Bu bağlamda kullanıldığında immünolojik bağlanma genel olarak bir immünoglobulin molekülü ile immünoglobulinin spesifik olduğu bir antijen arasında meydana gelen tipte kovalent olmayan etkileşimlere karşılık gelir. İmmünolojik bağlanma etkileşimleri gibi bağlanma kuvveti veya afinitesi, etkileşimin ayrılma sabiti (K_d) cinsinden ifade edilebilir, burada daha küçük bir K_d , daha yüksek bir afiniteyi temsil eder. Seçilen polipeptitlerin immünolojik bağlanma özellikleri, teknikte iyi bilinen yöntemler kullanılarak nicelendirilebilir (bakınız örn., Davies ve arkadaşları, Annual Rev. Biochem. 59:439-473, 1990). Bazı açıklayıcı düzeneklerde bir antikor, bir yakalama ögesi veya antikora spesifik bir dedektör (örn., antijen veya antijenik peptit) için en az yaklaşık 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 veya 50 nM’lik bir afiniteye sahiptir. Başka bir örnek olarak bir yakalama ögesi veya antikora spesifik dedektör, antikor için, örnek içindeki diğer antikorların en az yaklaşık

1.5 katı, 2 katı, 2.5 katı, 3 katı veya daha yüksek bir afiniteye sahip olabilir.

Benzer şekilde bir Fc bağlanma molekülü, bir immünoglobulinin Fc bölgesi ile saptanabilen bir düzeyde reaksiyona girer ve benzer koşullar altında alakasız polipeptitler veya ajanlar ile istatistiksel açıdan anlamlı tarzda saptanabilen şekilde reaksiyona girmezse bunun, bu Fc bölgesine “spesifik olarak bağlandığı” söylenir. Bazı açıklayıcı düzeneklerde bir Fc bağlanma molekülü, seçilen bir immünoglobulin izotipinin Fc bölgesi için en az yaklaşık 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 veya 50 nM’lik bir afiniteye sahiptir. Bazı Fc bağlanma molekülleri, bir veya daha fazla immünoglobulin izotipi için diğerlerine göre daha güçlü veya daha zayıf afiniteye sahip olabilir.

Bu afinite veya spesifiklik derecesi, örn., rekabetçi bağlanma çalışmaları dahil çeşitli rutin prosedürlerden biri ile belirlenebilir. Bir ELISA deneyinde pozitif bir tepki, bir kontrolün veya kontrol grubunun ortalama değerinden 2 veya 3 standart sapma kadar daha yüksek bir değer olarak tanımlanır.

Yukarıda belirtildiği gibi bazı dedektör molekülleri, örneğin Fc bağlanma molekülleri, antijenler ve/veya antijenik peptitler, saptanabilen bir öğeye konjüge edilir. Konjügasyon tipik olarak kovalent ekleme yoluyla yapılır. Saptanabilen öğeler arasında "direkt olarak saptanabilen öğeler", örneğin metal nano-partiküller, metal nano-kabuklar, renkli lateks partikülleri, radyoizotoplar ve floroforlar

ve "dolaylı olarak saptanabilen ögeler" bulunur, bunlar ise sıklıkla sinyalleme sağlamak için ligand-reseptör etkileşimlerine dayanır. İlk belirtilen durumda dedektör molekül (örn., antijenik peptit, Fc bağlanma molekülü örneğin Protein A/G), saptanabilen öğeye direkt olarak konjüge edilir. İkinci belirtilen durumda dedektör molekül, bir liganda konjüge edilir, bu da bunun ligand reseptörü ile etkileşime girer, bu ise direkt olarak saptanabilen öğeye konjüge edilmiştir veya tersi de geçerlidir. Ligandların örnekleri arasında biyotin (örn., bir sistein veya lizin tortusu aracılığıyla), lipit molekülleri (örn., bir sistein tortusu aracılığıyla) ve taşıyıcı proteinler (örn., serum albümini) bulunur. Biyotin gibi ligandlara ekleme, dedektörün ligand reseptörleri, örneğin avidin, streptavidin veya nötravidin ile birleştirilmesi için faydalı olabilir. Avidin, streptavidin, nötravidin ise direkt olarak saptanabilen öğeye (örn., görselleştirilebilen bir sinyalleme yarımına, örneğin kolodyal altın, bir flüoresan yarım veya yabanturpu peroksidaz veya alkalın fosfataz gibi bir enzime) bağlanabilir. Alternatif olarak dedektör moleküller, bir ligand reseptörüne, örneğin avidin, streptavidin veya nötravidine füzyonla birleştirilebilir veya bağlanabilir, bu şekilde karşılık gelen ligand ile bir birleşme sağlanır, bu ise direkt olarak saptanabilen bir öğeye bağlanır. Diğer ligand-reseptör çiftlerinin örnekleri teknikte iyi bilinir ve benzer şekilde kullanılabilir.

Direkt olarak saptanabilen ögelerin (veya sinyalleme yarımının) örnekleri arasında radyoizotoplar, floroforlar, boyalar, enzimler, nanopartiküller, renkli lateks partikülleri, kemilüminesan markerler, ışık yayan boyalar ve burada tarif edilen ve teknikte bilinen diğerleri bulunur.

Direkt olarak saptanabilen ögeler olarak kullanılabilen radyoizotopların örnekleri arasında ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H ve ^{125}I bulunur. Bu radyoizotoplar, farklı yarı ömürlere, bozulma tiplerine ve enerji düzeylerine sahiptir, bunlar ise belirli bir protokolün ihtiyaçlarına uyacak şekilde tasarlanabilir. Örneğin ^3H , düşük arka plan düzeyleri ile sonuçlanan bir düşük enerji yayıcıdır, bununla birlikte bu düşük enerji, otoradyografi ve diğer ölçümler için uzun süreler ile sonuçlanır.

- 10 Direkt olarak saptanabilen ögeler olarak kullanılabilen floroforların veya florokromların örnekleri arasında floresin, tetrametilrodamin, Texas Kırmızı ve bir dizi başkaları bulunur (örn., Haugland, Handbook of Fluorescent Probes - 9th Ed., 2002, Molec. Probes, Inc., Eugene OR; Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-10th Ed., 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA). Işık yayan veya başka şekilde saptanabilen boyalar da dahildir. Boyalar tarafından yayılan ışık, görünür ışık veya görünmeyen ışık, örneğin ultraviyole veya kızıl ötesi ışık olabilir. Örnek düzeneklerde boya, bir floresan rezonans enerji transferi (FRET) boyası; bir ksanten boyası, örneğin floresin ve rodamin; alfa veya beta pozisyonunda bir amino grubuna sahip bir boya (örneğin bir naftilamin boyası, 1-dimetilaminonaftil-5-sülfonat, 1-anilino-8-naftalend sülfonat ve 2-p-touidinil-6-naftalen sülfonat); 3-fenil-7-izosiyanatokumarine sahip bir boya; bir akridin, örneğin 9-izotiyosiyanatoakridin ve turuncu akridin; bir piren, bir bensoksadiazol ve bir stilben; 3-(ϵ -karboksipentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloksakarbosiyanine (CYA) sahip bir boya; 6-karboksi floresin (FAM); 5&6-karboksirodamin-110 (R110); 6-karboksirodamin-6G

(R6G); N,N,N',N'-tetrametil-6-karboksirodamin (TAMRA); 6-karboksi-X-rodamin (ROX); 6-karboksi-4',5'-dikloro-2',7'-dimetoksifloresin (JOE); ALEXA FLUOR™; Cy2; Texas Kırmızı ve Rodamin Kırmızı; 6-karboksi-2',4,7,7'-tetraklorofloresin (TET); 6-karboksi-2',4,4',5',7,7'-heksaklorofloresin (HEX); 5-karboksi-2',4',5',7'-tetraklorofloresin (ZOE); NAN; NED; Cy3; Cy3.5; Cy5; Cy5.5; Cy7; ve Cy7.5; IR800CW, ICG, Alexa Fluor 350; Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 532; Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 680 veya Alexa Fluor 750 olabilir.

10

Nano-partiküller olarak adlandırılan çok küçük partiküller de direkt olarak saptanabilen öğeler olarak kullanılabilir. Bu partiküllerin ebadı genellikle 1-1000 nm arasında değişir ve bunlar arasında altın ve gümüş partikülleri ve kuantum noktaları gibi farklı kimyasal yapılar bulunur. Açılı gelen beyaz ışık ile ışınım yapıldığında yaklaşık 40-120 nm arasında değişen gümüş veya altın nano-partikülleri, yüksek yoğunluklu monokromatik ışık yayacaktır. Yayılan ışığın dalga boyu, partikülün büyüklüğüne bağlıdır. Yakın civarda bulunan dört ila beş farklı partikülün her biri, monokromatik ışık yayacaktır, bunlar da üst üste bindirildiğinde spesifik, eşsiz bir renk verecektir. Gümüş veya altın partikülleri gibi türevlendirilmiş nano-partiküller, proteinler, antikorlar, küçük moleküller, reseptör ligandları ve nükleik asitler gibi geniş bir molekül dizisine eklenebilir. Nano-partiküllerin spesifik örnekleri arasında metalik nano-partiküller veya metalik nano-kabuklar, örneğin altın partikülleri, gümüş partikülleri, bakır partikülleri, platinyum partikülleri, kadmiyum partikülleri, kompozit partiküller, altın delik küreler, altın kaplı silika nano-kabuklar ve silika kaplı altın kabuklar bulunur. Ayrıca silika, lateks, polistiren,

25

polikarbonat, poliakrilat, PVDF nano-partiküller ve bu materyallerin renkli partikülleri de dahildir.

Direkt olarak saptanabilen ögeler olarak kuantum noktaları da kullanılabılır. Kuantum noktaları, 1-5 nm çapında, geniş bir dalga boyu aralığı üzerinden ışık ile uyarılabilen, flüoresan çıkaran kristallerdir. Uygun bir dalga boyuna sahip ışık tarafından uyarıldığında bu kristaller, dalga boyu kimyasal kompozisyonlarına ve ebatlarına bağlı monokromatik ışık gibi ışık yayar. CdSe, ZnSe, InP veya InAs gibi kuantum noktaları, eşsiz optik özelliklere sahiptir; bunlar ve benzeri kuantum noktaları, bir dizi ticari kaynaktan temin edilebilir (örn., NN-Labs, Fayetteville, AR; Ocean Nanotech, Fayetteville, AR; Nanoco Technologies, Manchester, UK; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

15

Bir sinyal varlığının saptanması, etiket veya deneyin kullandığı saptanabilen öge için uygun bir vasıta ile yapılabilir. Örneğin saptama adımı, yakalama kompleksinin bir renk değişimi açısından gözle incelenmesini veya yakalama kompleksinin bir fiziksel-kimyasal değişim açısından incelenmesini içerebilir. Fiziksel-kimyasal değişimler, oksidasyon reaksiyonları veya başka kimyasal reaksiyonlar ile meydana gelebilir. Bunlar, bir spektrofotometre veya benzeri kullanılarak gözle saptanabilir.

25 Bir sinyal tipik olarak negatif kontrol sinyalinden daha güçlü olduğunda konu olan bir antikoru varlığının göstergesidir; bununla birlikte tüm testler bir negatif kontrol gerektirmez. Şart olmamakla birlikte bazı durumlarda bir pozitif sinyal kuvveti, sayısal olarak

nicelendirilebilir ve bu kuvvet, bir kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğunda antikorun varlığının göstergesidir. Bazı durumlarda belirli bir test ile bağlantılı rutin bilgiler ve deneyim, bir sinyalin pozitif veya negatif olduğunu tespit eder ve böylelikle konu olan bir antikorun varlığını veya yokluğunu gösterir.

Bir örnek olarak belirli lateral akış deneyi cihazlarından gelen sinyal, Reaktivite skoruna göre ölçülebilir; bu skor 0-5 arasında olup (bunlar arasındaki ondalık sayılar da dahildir) daha güçlü ve daha pozitif bir sinyale daha yüksek bir sayı skoru verilir. Bir negatif kontrol tipik olarak sifıra yakın bir skora, örneğin yaklaşık 0.25 veya daha azına sahip olacaktır.

Saptama sinyali örneğin tek tek reaktanların oranı ayarlanarak optimize edilebilir. Bir örnek, (i) saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгат(lar)ı ve (ii) saptanabilen antijen/antijenik peptit konjüгат(lar)ı oranının şu şekilde belirlenmesini içerir: (i):(ii) oranı (örn., molar oranı) yaklaşık 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1 veya 200:1 olup bunlar arasındaki tüm oranlar ve oran aralıkları da dahildir. Bazı düzeneklerde saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатının saptanabilen bir antijen/antijenik peptit konjüгатına oranı, yaklaşık 20:1 ile yaklaşık 1:20, tercihen yaklaşık 20:1 ile yaklaşık 1:1 ve daha fazla tercihen yaklaşık 16:1 ile yaklaşık 2:1'dir. Bazı düzeneklerde saptanabilen konjüгат içindeki Fc bağlanma molekülü, Protein A,

Protein G, Protein A/G füzyon proteinleri, Protein L veya bunların, bir antikorun Fc bölgesine spesifik olarak bağlanma yeterliliğini muhafaza eden fragmanları ve varyantlarıdır.

- 5 Bazı düzeneklerde bir protein A ve protein G karışımı, Fc bağlanma molekülü konjüгатları olarak kullanılır, buradaki her protein A ve protein G molekülü, saptanabilen bir öğeye konjüge edilir. Protein A ve protein G'nin her ikisinin saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатı olarak kullanıldığı düzeneklerde saptama sinyali, protein
- 10 A'nın protein G'ye olan oranı, saptanacak immünoglobulin sınıfı tipine göre değiştirilerek optimize edilebilir. Yukarıda açıklandığı gibi protein A ve protein G, farklı immünoglobulin sınıflarının (örn., IgG, IgE, IgD, IgM veya IgA'nın) Fc bölgelerine farklı bağlanma afinitelerine sahiptir. Buna göre protein A'nın protein G'ye oranı,
- 15 saptanması arzu edilen immünoglobulin sınıfına göre ayarlanabilir. Örnek olarak baskın şekilde IgM immünoglobulinlerinin saptanması arzu edildiğinde protein A'nın protein G'ye daha düşük bir oranı (yani protein A konjüгатına göre daha yüksek miktarda bir protein G konjüгатı) kullanılabilir. Diğer yandan baskın şekilde IgG
- 20 immünoglobulinlerinin saptanması arzu edildiğinde protein A'nın protein G'ye daha yüksek bir oranı (yani protein G konjüгатına göre daha yüksek miktarda bir protein A konjüгатı) kullanılabilir. Protein A'nın protein G konjüгатlarına örnek oranları (örn., molar oranları) arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte 1:20, 1:19, 1:18, 1:17,
- 25 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1 ve 20:1 bulunur. Bazı düzeneklerde protein A konjüгатının protein G konjüгатına oranı, yaklaşık 10:1 ila

yaklaşık 1:10, tercihen yaklaşık 5:1 ila yaklaşık 1:5 ve daha fazla tercihen yaklaşık 2:1 ila yaklaşık 1:2'dir. Bir düzeneğe protein A konjugatının protein G konjugatına oranı yaklaşık 1:1'dir.

- 5 Bazı düzeneelerde saptama sinyali ayrıca protein A'nın protein G'ye oranlarının, saptanabilen antijen/antijenik peptit konjugat(lar)ı miktarına göre ayarlanması suretiyle optimize edilebilir. Örneğin bazı düzeneelerde protein A konjugatının protein G konjugatına ve saptanabilen antijen/antijenik peptit konjugatına oranı (örn., molar
- 10 oranı), yaklaşık 20:20:1 ila yaklaşık 1:1:20, yaklaşık 10:10:1 ila yaklaşık 2:2:1 veya yaklaşık 4:2:1 ila yaklaşık 1:2:1 olabilir.

- Spesifik antikorların saptanması için antijenlerin kullanıldığı immüno-deneylere yönelik protokoller teknikte iyi bilinir. Örneğin
- 15 geleneksel bir sandviç deneyi kullanılabilir veya geleneksel rekabetçi bir deney formatı kullanılabilir. Bazı uygun deney tiplerinin tartışması için bakınız Current Protocols in Immunology (Coligan ve arkadaşları, editors, John Wiley & Sons, Inc). Bazı düzeneelerde saptama adımı, bir lateral akış immüno-deneyinin yapılmasını içerir. Bazı
- 20 düzeneelerde saptama adımı, bir ELISA deneyinin yapılmasını içerir. Bazı düzeneelerde saptama adımı, bir analitik rotorda örneğin döndürülmesini içerir. Yine başka düzeneelerde saptama adımı, bir elektrokimyasal, optik veya opto-elektronik sensör ile örneğin analiz edilmesini içerir.

25

Özellikle faydalı bir deney formatı, lateral akış immüno-deney formatıdır. Sınırlayıcı olmayan bir örnek olarak bir Fc bağlanma molekülü (örn., Protein A ve/veya G) ve isteğe bağlı olarak antikora

spesifik bir antijen içeren raportör veya dedektör molekülleri, bir saptanabilen öge (örn., kolodyal altın) ile etiketlenir ve sonra kurutulur ve bir cam elyaf ped (aynı uygulama pedi veya konjüгат pedi) üzerine konulur. Etiketlenmemiş antijen veya antijenik peptit (yani, yakalama ögesi), bir membran, örneğin nitroselüloz veya bir PVDF (poliviniliden florid) membran (örn., bir Immobilon™ membran) üzerine immobilize edilir. Bir örnek çözeltisi (kan, serum, vb.), örnek uygulama pedine uygulandığında (veya konjüгат pedi içinden aktığında) etiketli dedektör(ler)i çözer, bunlar da varsa örnek içindeki antikorlara bağlanır. Elde edilen kompleksler daha sonra bir sonraki membrana (yakalama ögesini ihtiva eden PVDF veya nitroselüloz) kılcal hareket ile taşınır. Yakalama ögesine yönelik antikorlar varsa bunlar, membran üzerindeki dedektör(ler) ve tanısal yakalama ögesi ile kompleks oluşturarak bir sinyal (örn., görülebilen veya görselleştirilebilen bir bant) üretir.

Bir başka sınırlayıcı olmayan örnek olarak örnek pedi, dedektör moleküller (yani, saptanabilen Fc bağlanma molekülleri, saptanabilen antijen konjüгатları) ile çizilmez, yani örnek pedi, önceden immobilize edilmiş dedektör moleküllerinden oluşan bir konjüгат bölgesi ihtiva etmez. Tüm diğer bileşenler esasen yukarıda tarif edilenle aynıdır, burada etiketlenmemiş antijen veya antijenik peptit (yani, yakalama ögesi), bir membran, örneğin nitroselüloz veya bir PVDF (poliviniliden florid) membran (örn., bir Immobilon™ membran) üzerine immobilize edilir. Test örneği (kan, serum, vb.), bir veya her iki dedektör molekülü ile önceden karıştırılır ve sonra örnek pedine uygulanır. Alternatif olarak test örneği ve dedektör molekülleri, aynı örnek pedine ayrı ayrı, aynı anda veya sırayla

uygulanır. Başka kombinasyonlar da teknikte uzman kişiler için açık olacaktır. Bunların karıştırılma veya uygulanma sırasından bağımsız olarak örnek içindeki antikorların elde edilen kompleksleri ve dedektör molekülü(leri) daha sonra bir sonraki membrana (yakalama 5 ögesini ihtiva eden PVDF veya nitroselüloz) kılcal hareket ile taşınır. Yakalama ögesine yönelik antikorlar varsa bunlar, membran üzerindeki dedektör(ler) ve tanısal yakalama ögesi ile kompleks oluşturarak bir sinyal (örn., görülebilen veya görselleştirilebilen bir bant) üretir.

10

Spesifik düzeneklerde yöntemler, test örneğinin bir Protein A ve/veya Protein G-kolodyal altın konjüгатı (CGC) ile temas ettirilerek bir birinci kompleksin oluşturulmasını, birinci kompleksin, bir nitroselüloz veya PVDF membranından bir test bölgesi üzerinde 15 immobilize edilmiş bir peptit antijeni ile temas ettirilmesini içerir, buradaki peptit antijeni, bir mikrobiyal kaynaktan türetilir ve konu olan bir antikora (örn., bir anti-bakteriyel, anti-viral, anti-parazitik, anti-fungal antikora) spesifik olarak bağlanır. Peptit antijeni, BSA'ya konjüge edilebilir veya MAPS olarak sentezlenebilir. Protein A-CGC 20 ve/veya Protein G-CGC'den bir sinyalin test bölgesindeki varlığı, test örneği içinde antikor varlığının göstergesidir.

Bazı yöntemler ayrıca test örneğinin, yukarıda tarif edilen aynı peptit antijenini içeren bir peptit antijeni-CGC konjüгатı ile temas ettirilmesini içerir. Bazı düzeneklerde Protein A/G-CGC veya ikincil 25 antikor-CGC veya bunların bir kombinasyonu ve peptit antijen-CGC, test bölgesi ile çakışmayacak şekilde membranın (veya ayrı ancak bağlantılı bir membranın) bir konjüгат bölgesi üzerinde immobilize

edilir. Diğer düzeneklerde Protein A/G-CGC veya ikincil antikor-CGC veya bunların bir kombinasyonu ve peptit antijen-CGC, membran üzerinde immobilize edilmez, ancak bunun yerine test bölgesi ile birlikte yüzeye, aynı anda veya sırayla uygulanır. Protein

5 A/G-CGC ve/veya ikincil antikor-CGC ve peptit antijeni-CGC'den kombine sinyal, test örneği içinde antikor varlığını gösterir ve tipik olarak tek başına peptit antijeni-CGC ile yapılan, yani Protein A-CGC, Protein G-CGC veya ikincil antikor-CGC'nin bulunmadığı bir testten alınan sinyalden daha güçlüdür. Spesifik düzeneklerde peptit

10 antijeni, bir *Borrelia* antijenidir (doğal olarak var olan veya sentezlenmiş, örn., doğal olarak var olan antijene özdeş veya bunu taklit eden) ve test örneği, Lyme hastalığına sahip olduğundan şüphelenilen bir süjeden gelir. Bir pozitif sinyal, örnek içinde Lyme hastalığına spesifik antikorların varlığını tanımlar. Diğer düzeneklerde

15 peptit antijeni, bir *Ehrlichia* antijenidir (doğal olarak var olan veya sentezlenmiş, örn., doğal olarak var olan antijene özdeş veya bunu taklit eden) ve süjenin, Anaplasmataceae familyası, *Ehrlichia* ve *Anaplasma* cinsi bakterilerin neden olduğu, kene ile taşınan bir bakteriyel enfeksiyon olan *Ehrlichiosis*'e sahip olduğundan

20 şüphelenilir.

Kan ürünlerinin veya diğer fizyolojik veya biyolojik sıvıların taranmasına yönelik bir başka deney, bir enzim bağlı immünosorbent deneyi, yani bir ELISA'dır. Tipik olarak bir ELISA'da yakalama

25 öğeleri (örn., antikora spesifik antijenler), bir mikrotiter oyuğunun yüzeyine direkt olarak veya bir yakalama matrisi (örn., bir antikor) üzerinden adsorbe edilir. Yüzey üzerindeki kalıntı, spesifik olmayan protein bağlanma sahaları daha sonra uygun bir ajan, örneğin sıgır

serum albümini (BSA), ısı ile eylemsizleştirilmiş normal keçi serumu (NGS) veya BLOTTO (ayrıca bir prezervatif, tuzlar ve bir köpük önleme ajanı ihtiva eden, yağsız kuru süttten tamponlu bir çözelti) ile bloke edilir. Oyuk daha sonra konu olan bir antikoru ihtiva ettiğinden

5 şüphelenilen biyolojik bir örnek ile inkübe edilir. Örnek, çıplak uygulanabilir veya daha sık bir şekilde genellikle az miktarda (ağırlığa göre %0.1-5-0) protein, örneğin BSA, NGS veya BLOTTO ihtiva eden tamponlu bir çözelti içinde seyreltilebilir. Spesifik bağlanmanın meydana gelmesi için yeterli bir süre boyunca inkübe edildikten sonra

10 oyuk yıkanarak bağlanmamış protein çıkarılır ve sonra bir enzime veya başka bir etikete standart prosedürlerle konjüge edilmiş bir Fc bağlanma molekülü (örn., Protein A ve/veya Protein G) ve isteğe bağlı olarak başka bir antikora spesifik antijen (genellikle yakalama ögesi ile aynı) içeren bir veya daha fazla dedektör molekülü ile inkübe edilir

15 ve bloklama tamponu içinde çözülür. Etiket, yabanturpu peroksidaz (HRP), beta-galaktosidaz, alkalın fosfataz, glukoz oksidaz, vb. dahil çeşitli enzimler arasından seçilebilir. Tekrar spesifik bağlanmanın meydana gelmesi için yeterli zaman bırakılır, sonra oyuk tekrar yıkanarak bağlanmamış konjüгат çıkarılır ve enzim için uygun bir

20 substrat ilave edilir. Renk gelişmeye bırakılır ve oyuk içeriğinin optik yoğunluğu, görsel olarak veya aletlerle belirlenir (uygun bir dalga boyunda ölçülür). Kesme OD değeri, Lyme hastalığının endemik olmadığı bir alandan gelen kişilerden toplanan en az 50 serum örneğinin ortalama OD+3 standart sapması (SD) olarak veya bu tür

25 geleneksel tanımlarla tanımlanabilir. Çok spesifik bir deney söz konusu olduğunda OD+2 SD, bir kesme değeri olarak kullanılabilir. ELISA deneylerini yapma koşulları teknikte iyi bilinir.

Bir dizi geleneksel protein deney formatının, özellikle immüno deney formatlarının, burada tarif edilen çeşitli düzenekleri kullanmak üzere tasarlanabileceği teknikte uzman kişilerce anlaşılmalıdır. Bu buluş böylelikle belirli bir deney formatı seçimi ile sınırlanmaz ve teknikte uzman kişilerce bilinen deney formatlarını kapsadığına inanılır.

"Bir antikor ihtiva eden örnek" veya "bir örnek içinde bir antikorun saptanması" ifadelerinin bir antikorun bulunmadığı veya saptanmadığı örnekleri veya belirlemeleri (örn., saptama teşebbüslerini) hariç bırakması kast edilmez. Genel anlamda bu buluş, bir enfeksiyöz mikroba tepki olarak üretilen bir antikorun, saptanıp saptanmadığından bağımsız olarak bir örnek içinde bulunup bulunmadığını belirlemeye yönelik deneyler içerir.

Spesifik olarak reaksiyona girecek şekilde antijenleri/peptitleri ve antikorları reaksiyona sokmaya yönelik koşullar, teknikte uzman kişilerce iyi bilinir. Bakınız örn., Current Protocols in Immunology (Coligan ve arkadaşları, editors, John Wiley & Sons, Inc).

Cihazlar ve Kompozisyonlar

Bir başka yönde mevcut açıklama, bir örnek içindeki bir antikorun saptanmasına yönelik cihazlar içerir. Bazı düzenekler, bir örnek yükleme bölgesi, bir konjüгат bölgesi ve bir test bölgesi içeren antikor saptama cihazları veya antikor saptama sistemleri içerir. Konjüгат bölgesi tipik olarak test bölgesi ile çakışmaz; bununla birlikte örnek bölgesi ve bu iki bölge, işletim sırasında örnek yükleme bölgesine yüklendiğinde bir sıvı örnek, konjüгат bölgesi ve test bölgesi ile

akışkan iletişiminde olacak şekilde konfigüre edilir. Genellikle test örneği, kılcal hareket yoluyla konjüгат ve test bölgeleri içinden akar veya bunlarla iletişim kurar. Konjüгат bölgesi, bir birinci saptanabilen öğeye (yani, bir saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатı, 5 örneğin bir Protein A ve/veya Protein G konjüгатı veya Fc'ye spesifik bir ikinci antikor konjüгатına) konjüge edilmiş, mobilize edilebilen bir Fc bağlanma molekülü içerir ve test bölgesi, antikora spesifik olarak bağlanabilen, immobilize edilmiş bir yakalama öğesi içerir. Bu özelliklerin her biri burada başka bölümlerde tarif edilmiştir.

10

Bazı düzeneklerde cihaz ayrıca örnek yükleme bölgesine yüklendiğinde bir sıvı örnek ile akışkan iletişiminde olan bir kontrol bölgesi içerir. Yine sıvı örnek, kılcal hareket yoluyla kontrol bölgesi içinden akabilir veya bunlarla iletişim kurabilir. Bazı düzeneklerde 15 kontrol bölgesi, bir kontrol dedektörünü spesifik olarak bağlayabilen, immobilize edilmiş bir bağlanma ortağı içerir. Bir örnek olarak kontrol bölgesi, bir anti-protein A antikor, bir anti-protein G antikor veya protein A veya protein G ile reaktif memeli IgG'lerinden birini içerir.

20

Bazı cihazlar ayrıca test bölgesinin aşağı akışına konumlandırılmış bir absorbent ped içerir. Bazı cihazlarda konjüгат bölgesi, örnek yükleme bölgesinin yukarı akış tarafına konumlandırılır. Bazı cihazlarda konjüгат bölgesi, örnek yükleme bölgesinin yukarı akış tarafına 25 konumlandırılır. Bazı düzeneklerde örnek yükleme bölgesi, bir kan separatör materyali içerir.

Bazı durumlarda konjüгат bölgesi ayrıca mobilize edilebilen bir

ikinci dedektör içerir, buradaki ikinci dedektör, bir ikinci saptanabilen öğeye konjüge edilmiş bir antijen veya antijenik peptit içerir; adı geçen antijen veya antijenik peptit, antikora spesifik olarak bağlanabilir. Bazı düzeneklerde birinci (örn., saptanabilen Fc bağlanma molekülü) ve ikinci (örn., saptanabilen antijen konjüгатı) dedektörleri, aynı tipte saptanabilen öğeye sahiptir. Diğer düzeneklerde birinci ve ikinci dedektörler farklı tiplerde saptanabilen öğelere sahiptir. Belirli düzeneklerde birinci dedektörün ikinci dedektöre oranı (örn., molar oranı), arzu edilen sinyal amplifikasyon düzeyine ulaşacak şekilde ayarlanır. Örneğin birinci dedektörün (örn., saptanabilen Fc bağlanma molekülü, örneğin protein A/protein G'nin) ikinci dedektöre (örn., saptanabilen antijen konjüгатına) oranı, yaklaşık 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1 veya 200:1 olabilir; bunlar arasındaki tüm oranlar ve oran aralıkları da dahildir. Bazı düzeneklerde saptanabilen Fc bağlanma molekülü konjüгатının saptanabilen bir antijen/antijenik peptit konjüгатına oranı, yaklaşık 20:1 ila yaklaşık 1:20, tercihen yaklaşık 20:1 ila yaklaşık 1:1 ve daha fazla tercihen yaklaşık 16:1 ila yaklaşık 2:1'dir. Protein A ve protein G konjüгатlarının her ikisinin saptanabilen Fc bağlanma molekülleri olarak kullanıldığı düzeneklerde protein A konjüгатının protein G konjüгатına oranı, yukarıda tarif edildiği gibi saptanacak immünoglobulin sınıfına göre saptama sinyalini optimize edecek şekilde ayarlanabilir. Protein A konjüгатının protein G konjüгатına uygun oranları (örn., molar oranları) arasında, bunlarla sınırlı

olmamakla birlikte 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1 ve 20:1 bulunur. Bazı düzeneklerde protein A konjüгатının protein G konjüгатına oranı, yaklaşık 10:1 ile yaklaşık 1:10, tercihen yaklaşık 5:1 ile yaklaşık 1:5 ve daha fazla tercihen yaklaşık 2:1 ile yaklaşık 1:2'dir. Bir düzenekte protein A konjüгатının protein G konjüгатına oranı yaklaşık 1:1'dir.

10 Spesifik bağlanma deneylerinin, özellikle immünodeneylerin yapılmasına yönelik cihazlar bilinmektedir ve mevcut yöntemlerde kullanılmak üzere kolayca adapte edilebilir. Katı fazlı deneylerin genel olarak yapılması, bir ayırma adımı, örneğin çökeltme, santrifüjleme, filtreleme, kromatografi veya manyetizma gerektiren

15 heterojen deney yöntemlerinden daha kolaydır, çünkü reaktif maddelerin ayrılması daha hızlı ve daha basittir. Katı faz deney cihazları arasında mikrotiter plakalar, genel akış deneyi cihazları (örn., lateral akış immünodeney cihazları), batırma çubukları ve immüno-kılcal veya immünokromatografik immünodeney cihazları

20 bulunur.

Bazı düzeneklerde cihaz, bir lateral akış immünodeneyidir. Bazı düzeneklerde cihaz, bir ELISA deneyi için uygun bir mikrotiter plakadır. Bazı düzeneklerde cihaz, bir analitik rotorda kullanılmaya

25 uygundur. Yine başka düzeneklerde cihaz, bir elektrokimyasal, optik veya opto-elektronik sensör içerir.

Bazı düzeneklerde bir lateral akış cihazı, bir örnek/kan ayırma pedi,

nitroselüloz membran ve bir yuva içine konulan bir üst fitil kullanılarak yapılandırılır (bakınız, örn., Şekil 2). Nitroselüloz membran, bir yakalama ögesi, örneğin etiketsiz, antikora spesifik bir antijen (örn., bir peptit antijeni veya peptit harici antijen) içeren bir test çizgisi veya bölgesi ve isteğe bağlı olarak bir Fc bağlanma molekülüne reaktif bir antikor ihtiva eden bir kontrol çizgisi veya bölgesi ile çizilir (aşağıda gösterilmiştir). Konu olan bir antikoru ihtiva ettiğinden şüphelenilen bir örnek, saptanabilen bir Fc bağlanma molekülü konjüгатı ile önceden karıştırılabilir ve sonra lateral akış deneyi cihazına uygulanabilir. Ya da ön karıştırma yerine örnek ve Fc bağlanma molekülü, deney cihazına herhangi bir sırada aynı anda veya sırayla uygulanabilir.

Alternatif olarak nitroselüloz membran, yukarıdaki gibi hazırlanır ve ayrıca saptanabilen bir Fc bağlanma molekülü konjüгатı içeren, konjüгат ile test bölgelerinin çakışmadığı bir konjüгат çizgisi veya bölgesi ile çizilir. Bazı düzeneklerde daha sonra konu olan bir antikoru ihtiva ettiğinden şüphelenilen bir örnek, lateral akış deneyi cihazına uygulanabilir. Diğer düzeneklerde konu olan bir antikoru ihtiva ettiğinden şüphelenilen bir örnek, antikora spesifik olarak bağlanan (tipik olarak yakalama ögesi ile aynı bağlanma spesifikliğine sahip) saptanabilen bir antijen konjüгатı ile önceden karıştırılabilir ve sonra lateral akış deneyi cihazına uygulanabilir. Yukarıdakine benzer şekilde ön karıştırma yerine örnek ve saptanabilen antijen konjüгатı, deney cihazına herhangi bir sırada aynı anda veya sırayla uygulanabilir.

Bazı düzeneklerde bir lateral akış cihazı, bir örnek/kan ayırma pedi,

nitroselüloz membran ve bir yuva içine konulan bir üst fitil kullanılarak yapılandırılır (bakınız, örn., Şekil 2). Nitroselüloz membran, bir yakalama ögesi, örneğin etiketsiz, antikora spesifik bir antijen (örn., bir peptit antijeni veya peptit harici antijen) içeren bir test çizgisi veya bölgesi, isteğe bağlı olarak bir Fc bağlanma molekülüne reaktif bir antikor ihtiva eden bir kontrol çizgisi veya bölgesi (aşağıda gösterilmiştir) ve antikora spesifik olarak bağlanan (tipik olarak yakalama ögesi ile aynı bağlanma spesifikliğine sahip) saptanabilen bir antijen konjüгатı içeren bir konjüгат çizgisi veya bölgesi ile çizilir. Konjüгат ve test bölgeleri genellikle çakışmaz. Konu olan bir antikoru ihtiva ettiğinden şüphelenilen bir örnek, saptanabilen bir Fc bağlanma molekülü konjüгатı ile önceden karıştırılabilir ve sonra lateral akış deneyi cihazına uygulanabilir. Ayrıca ön karıştırma yerine örnek ve Fc bağlanma molekülü, deney cihazına herhangi bir sırada aynı anda veya sırayla uygulanabilir. Bir örnek düzenekte iki portlu cihazlar da bir test örneğinin, konjüгатın veya takip tamponunun sırayla uygulanması için kullanılabilir.

Bazı lateral akış cihazlarında nitroselüloz membran, bir yakalama ögesi, örneğin etiketsiz, antikora spesifik bir antijen (örn., bir peptit antijeni veya peptit harici antijen) içeren bir test çizgisi veya bölgesi, isteğe bağlı olarak bir Fc bağlanma molekülüne reaktif bir antikor ihtiva eden bir kontrol çizgisi veya bölgesi (aşağıda gösterilmiştir) ve antikora spesifik olarak bağlanan (tipik olarak yakalama ögesi ile aynı bağlanma spesifikliğine sahip), saptanabilen bir Fc bağlanma molekülü ve saptanabilen bir antijen konjüгатı içeren bir konjüгат çizgisi veya bölgesi ile çizilir. Daha sonra konu olan bir antikoru

ihtiva ettiğinden şüphelenilen bir örnek, lateral akış deneyi cihazına uygulanabilir.

Lyme'e spesifik antikorların saptanmasına yönelik örnek bir cihazda
 5 bir lateral akış cihazı, bir örnek/kan ayırma pedi, nitroselüloz membran ve bir yuva içine konulan bir üst fitil kullanılarak yapılandırılır (bakınız, örn., Şekil 2). Nitroselüloz membran, *Borrelia* antijenlerini (bakınız örn., US2011136155) taklit veya simüle eden peptitlerin bir karışımını içeren bir test çizgisi veya bölgesi ve Protein
 10 A'ya veya Protein G'ye reaktif bir immünoglobulin (örn., anti-Protein A IgG, fare, insan veya başka Protein A'ya reaktif IgG, vb.) içeren bir kontrol çizgisi veya bölgesi ile çizilir. *Borrelia burgdorferi*'ye yönelik antikorlar ihtiva ettiğinden şüphelenilen bir örnek, Protein A ve/veya G'nin kolodyal altın konjüгатları (Protein A/G-CGC) veya (ii) Protein
 15 A/G-CGC ve *Borrelia* antijenlerinin kolodyal altın konjüгатlarını (*Borrelia* antijeni-CGC) içeren bir karışım ile karıştırılabilir. Bu örnek konjüгатı karışımı daha sonra lateral akış deneyi cihazına uygulanabilir.

20 Alternatif olarak bir lateral akış cihazı, yukarıdaki gibi yapılandırılır, ancak burada nitroselüloz ped, test bölgesinden ayrı bir veya daha fazla konjüгат bölgesi ile çizilir. Konjüгат bölgeleri, örneğin (i) tek başına Protein A/G-CGC, (ii) tek başına *Borrelia* antijeni-CGC veya (iii) Protein A/G-CGC ve *Borrelia* antijeni-CGC kombinasyonu
 25 içerebilir. Burada veya bu başvuruda başka yerlerde kullanıldığı gibi *Borrelia* antijeni, *Ehrlichia* antijeni veya bir antijen veya antijenik peptit, sırasıyla doğal *Borrelia* antijenini, doğal *Ehrlichia* antijenini veya herhangi bir doğal antijeni taklit veya simüle eden bir sentetik

peptit karışımını içerir. Bazı düzeneklerde örneğin (i) veya (iii)'de test örneği, önceden karıştırılmadan lateral akış cihazına kendi başına uygulanır. Diğer düzeneklerde örneğin (i)'de örnek, *Borrelia* antijeni-CGC ile önceden karıştırılabilir ve sonra lateral akış cihazına uygulanabilir. Bazı düzeneklerde örneğin (ii)'de örnek, Protein A/G-CGC ile önceden karıştırılabilir ve sonra lateral akış cihazına uygulanabilir. Bununla birlikte bu örnek kombinasyonlar sınırlayıcı değildir ve diğer olasılıklar da teknikte uzman kişiler için açık olacaktır.

10

Protein A/G-CGC, örnek içinde antikor ve isteğe bağlı *Borrelia* antijeni-CGC içeren yakalama kompleksleri, örnek/kan ayırma pedi üzerinden taşınma ve isteğe bağlı konjüгат çizgisi(leri) ve test çizgisi(leri) üzerinden migrasyon sırasında oluşturulur. Koşullara bağlı olarak (örn., isteğe bağlı *Borrelia* antijeni-CGC kullanımı), bir kompleks veya sandviç, immobilize edilmiş ve etiketsiz *Borrelia* antijeni, antikor ve etiketli Protein A/G-CGC'den oluşur. *Borrelia* antijeni-CGC varlığında bir kompleks veya sandviç, etiketsiz *Borrelia* antijeni, antikor, etiketli *Borrelia* antijeni-CGC ve etiketli Protein A/G-CGC'den oluşur. Protein A/G-CGC'nin son bahsedilen komplekse ilavesi ayrıca etiketli *Borrelia* antijeni-CGC'den gelen sinyali amplifiye eder. Bazı düzeneklerde artan amplifikasyon, burada tarif edildiği ve teknikte bilindiği gibi tüm reaktanların oranları ayarlanarak sağlanabilir.

25

Ehrlichiosis'e spesifik antikorların saptanmasına yönelik örnek bir cihazda bir lateral akış cihazı, bir örnek/kan ayırma pedi, nitroselüloz membran ve bir yuva içine konulan bir üst fitil kullanılarak

yapılandırılır. Nitroselüloz membran, bir Ehrlichia antijeni içeren bir test çizgisi veya bölgesi ve Protein A'ya veya Protein G'ye reaktif bir immünoglobulin (örn., anti-Protein A IgG) içeren bir kontrol çizgisi veya bölgesi ile çizilir. Ehrlichia'ya (örn., E. canis, E. chaffeensis, E. ewingii,) yönelik antikorlar ihtiva ettiğinden şüphelenilen bir örnek, Protein A ve/veya G'nin kolodyal altın konjüгатları (Protein A/G-CGC) veya (ii) Protein A/G-CGC ve Ehrlichia antijeninin kolodyal altın konjüгатlarını (Ehrlichia antijeni-CGC) içeren bir karışım ile karıştırılabilir. Bu örnek konjüгатı karışımı daha sonra lateral akış deneyi cihazına uygulanabilir.

Alternatif olarak bir lateral akış cihazı, yukarıdaki gibi yapılandırılır, ancak burada nitroselüloz ped, test bölgesinden ayrı bir veya daha fazla konjüгат bölgesi ile çizilir. Konjüгат bölgeleri, örneğin (i) tek başına Protein A/G-CGC, (ii) tek başına Ehrlichia antijeni-CGC veya (iii) Protein A/G-CGC ve Ehrlichia antijeni-CGC kombinasyonu içerebilir. Bazı düzeneklerde örneğin (i) veya (iii)'de test örneği, önceden karıştırılmadan lateral akış cihazına kendi başına uygulanır. Diğer düzeneklerde örneğin (i)'de örnek, Ehrlichia antijeni-CGC ile önceden karıştırılabilir ve sonra lateral akış cihazına uygulanabilir. Bazı düzeneklerde örneğin (ii)'de örnek, Protein A/G-CGC ile önceden karıştırılabilir ve sonra lateral akış cihazına uygulanabilir. Bununla birlikte bu örnek kombinasyonlar sınırlayıcı değildir ve diğer olasılıklar da teknikte uzman kişiler için açık olacaktır.

25

Protein A/G-CGC, örnek içinde antikor ve isteğe bağlı Ehrlichia antijeni-CGC içeren yakalama kompleksleri, örnek/kan ayırma pedi üzerinden taşınma ve isteğe bağlı konjüгат çizgisi(leri) ve test

çizgisi(leri) üzerinden migrasyon sırasında oluşturulur. Koşullara bağlı olarak (örn., isteğe bağlı Ehrlichia antijeni-CGC kullanımı), bir kompleks veya sandviç, immobilize edilmiş ve etiketsiz Ehrlichia antijeni, antikor ve etiketli Protein A/G-CGC'den oluşur. Ehrlichia antijeni-CGC varlığında bir kompleks veya sandviç, etiketsiz Ehrlichia antijeni, antikor, etiketli Ehrlichia antijeni-CGC ve etiketli Protein A/G-CGC'den oluşur. Protein A/G-CGC'nin son bahsedilen komplekse ilavesi ayrıca etiketli Ehrlichia antijeni-CGC'den gelen sinyali amplifiye eder. Bazı düzeneklerde artan amplifikasyon, burada tarif edildiği ve teknikte bilindiği gibi tüm reaktanların oranları ayarlanarak sağlanabilir.

Bir ELISA için uygun bir mikrotiter plakanın bir düzeneğinde bir yakalama ögesi, doksan altı oyuklu bir ELISA plakası veya streptavidin kaplı denk bir katı faz veya denk bir biyotin bağlanma bileşiği, örneğin avidin veya nötravidin gibi bir yüzey üzerine, bir alkalın kaplama tamponu içinde optimum konsantrasyonda immobilize edilir ve 4°C'de bir gece süreyle inkübe edilir. Standart yıkama tamponları ile uygun sayıda yıkama yapıldıktan sonra bir Fc bağlanma molekülünün ve isteğe bağlı olarak yakalama ögesi olarak kullanılanla aynı antijenin biyotiniyle edilmiş formlarının optimum konsantrasyonu, geleneksel bir bloklama tamponu içinde çözülür, her oyuğa uygulanır. Daha sonra bir örnek ilave edilir ve deney, burada tarif edilen ve teknikte bilinen şekilde ilerler.

25

Bir başka yönde mevcut açıklama, bir örnek içinde bir antikoron saptanması ile alakalı kompozisyonlar sunar. Bazı düzenekler, bir yakalama ögesi, bir test örneği içinde bir antikor ve bir birinci

dedektör içeren bir veya daha fazla yakalama kompleksi ile ilgilidir, buradaki yakalama ögesi, antikora bağlanır ve buradaki birinci dedektör, bir birinci saptanabilen ögeye konjüge edilmiş ve antikorun Fc bölgesine bağlanan bir Fc bağlanma molekülü içerir. Bazı düzenekler ayrıca bir ikinci dedektör içerir, buradaki ikinci dedektör, antikorun değişken bölgesine spesifik olarak bağlanır. Bazı düzeneklerde yakalama kompleksi, bir katı veya yarı katı destek gibi bir yüzeyin bir test bölgesi üzerinde immobilize edilir. Örneğin bazı düzeneklerde katı destek, bir tane (örn., bir kolodyal partikül veya bir nano-partikül), bir lateral akış immüno deney cihazında bir akış yolu, bir analitik rotorda bir akış yolu veya bir tüp veya bir oyuktur (örn., bir plakada). İsteğe bağlı ikinci dedektör konjüгатı ve isteğe bağlı test yüzeyi dahil bu ve ilgili düzeneklerin bir gösterimi için Şekil 1'e bakınız.

15

Belirli düzeneklerde kompleks, konu olan bir antikor (örn., bir anti-mikrobiyal antikor, örneğin bir anti-viral, anti-bakteriyel, anti-fungal veya anti-parazitik antikor), bir Protein A- ve/veya Protein G-konjüгатı, immobilize edilmiş, antikora spesifik bir antijen ve isteğe bağlı olarak bir antijen konjüгатı içerir. Bazı düzeneklerde Protein A-ve/veya Protein-G konjüгатı, bir altın nano-partikülü (örn., bir Protein A-CGC veya Protein G-CGC - "kolodyal altın konjüгатı") içerir ve antijen konjüгатı, bir altın nano-partikülü (örn., bir antijen-CGC) içerir. Bazı düzeneklerde antijen konjüгатı veya antijen-CGC, burada tarif edilen ve teknikte bilinen bir mikrobiyal antijen, örneğin bir viral, bakteriyel, mantar veya parazitik antijen içerir. Spesifik düzeneklerde antijen konjüгатı veya antijen-CGC, Lyme hastalığına spesifik bir antijen, örneğin bir Borrelia antijeni (bakınız yukarıda) içerir. Diğer

25

düzeneklerde antijen konjüгатı veya antijen-CGC, Ehrlichiosis hastalığına spesifik bir antijen, örneğin bir Ehrlichia antijeni içerir.

Kitler

5

Yine bir başka yönde tarifname, kitler sunar. Bazı düzeneklerde kitler, burada tarif edilen bir cihaz veya sistem içerir. Bazı düzeneklerde kitler, burada tarif edilen iki, üç, dört veya daha fazla cihaz veya sistem içerir.

10

Belirli tiplerde deneyler için reaktif maddeler de burada açıklanan kitler içinde sunulabilir. Böylelikle kitler, nano-partiküllerin, tanelerin (örn., bir aglutinasyon deneyi veya bir lateral akış deneyi için uygun) bir popülasyonunu veya bir plaka (örn., bir ELISA deneyi için uygun bir plaka) içerebilir. Diğer düzeneklerde kitler, bir cihaz, örneğin bir lateral akış immünodeney cihazı, bir analitik rotor veya bir elektrokimyasal, optik veya opto-elektronik sensör içerir. Nano-partikül popülasyonu, taneler, plaka ve cihazlar, bir immünodeneyin yapılması için faydalıdır. Örneğin bunlar, bir örnekten bir antikor, bir antijenik peptit (etiketli ve/veya etiketsiz) ve bir Fc bağlanma molekülü içeren bir antikor-peptit kompleksi oluşumunun saptanması için faydalı olabilir.

15

25

Bazı düzeneklerde bir antijen (veya farklı antijenlerin bir karışımı), bir altın nano-partikül gibi saptanabilen bir öğeye konjüge edilir; bu aynı antijen (veya antijen karışımı) ayrıca bir plaka, bir nitroselüloz test yüzeyi veya başka bir test yüzeyi veya cihazına eklenir veya bunların üzerine immobilize edilir ve bir Fc bağlanma molekülü, bir altın nano-

partikül gibi saptanabilen bir öğeye konjüge edilir. Spesifik kitlerde bir antijenik peptit, bir altın nano-partiküle konjüge edilir ve isteğe bağlı olarak BSA'ya konjüge edilir; bu aynı antijen (altın partikülü olmadan, ancak isteğe bağlı olarak BSA'ya konjüge edilmiş şekilde),
 5 tanımlı bir test bölgesi veya bir nitroselüloz yüzey şeridi üzerine immobilize edilir ve Protein A ve/veya Protein G, isteğe bağlı olarak bir lateral akış deney cihazı ihtiva eden bir kitin parçası olarak bir altın nano-partiküle konjüge edilir. Bazı düzeneklerde Protein A- ve/veya Protein G-altın partikülü konjüгатı, nitroselüloz yüzeyinin ayrı bir
 10 bölgesi, yani test bölgesi ile çakışmayan bir konjüгат bölgesi üzerine immobilize edilir.

Ek olarak kitler, çeşitli seyrelticiler ve tamponlar, etiketli konjüгатlar veya spesifik olarak bağlanan antijenlerin veya antikorların
 15 saptanması için başka ajanlar ve başka sinyal üretici reaktif maddeler, örneğin enzim substratları, kofaktörler ve kromojenler içerebilir. Bir kitin diğer bileşenleri, teknikte uzman kişilerce kolayca belirlenebilir. Bu bileşenler, kaplama reaktif maddeleri, bir Fc bağlanma molekülü örneğin Protein A ve/veya Protein G için spesifik poliklonal veya
 20 monoklonal yakalama antikorları veya iki veya daha fazla antikorun bir kokteyli, standart olarak antijenlerin veya antikorların saflaştırılmış veya yarı saflaştırılmış özütleri, monoklonal antikor dedektör antikorları, buna konjüge edilmiş gösterge molekülü ile bir anti-fare, anti-köpek, anti-tavuk veya anti-insan antikoru, kolorimetrik
 25 karşılaştırmalar için gösterge şemaları, tek kullanımlık eldivenler, dekontaminasyon talimatları, uygulama çubukları veya kapları, bir örnek hazırlama kabı, vb. içerebilir. Bir düzenekte bir kit, bir peptit-antikor kompleksinin oluşumuna izin veren bir reaksiyon ortamının

oluşturulması için uygun tamponlar veya başka reaktif maddeler içerir.

Bu kitler, burada başka bölümlerde tarif edilen ve teknikte bilinen bir mikrobiyal ajanın, özellikle patojenik mikrobiyal ajanların enfeksiyonuna tanı konulması için klinik bir laboratuara elverişli ve verimli bir yol sunar. Bu kitler ayrıca bir klinik laboratuvarın, konu olan bir antikorun varlığı ile ilişkili başka durumlara tanı koyması için elverişli ve verimli bir yol sunar. Örneğin bazı oto-immün bozukluklar, bazı antikor tipleri ile bağlantılı olabilir. Böylelikle hastalıkla ilişkili antikor/antiijen kombinasyonlarının bilindiği ölçüde adı geçen kitler, bu hastalıkların hassas ve doğru tanı araçlarını sağlayabilir. Spesifik kitler, *Borrelia*, örneğin bir *B. burgdorferi*'nin saptanmasını sağlar ve böylelikle Lyme hastalığı tanısına yardımcı olur.

Bazı düzeneklerde kitler ayrıca bir talimat içerir. Örneğin bazı düzeneklerde kitler, bir antikoru, örneğin bir mikrobiyal antiijene (örn., *Borrelia* antiijenine, *Ehrlichia* antiijenine) yönelik bir antikoru saptamak veya bir hastalığa, örneğin mikrobiyal ilişkili bir hastalığa (örn., Lyme hastalığı, *Ehrlichiosis*) tanı koymak için kitin nasıl kullanılacağını gösteren bir talimat içerir. Bazı düzeneklerde kitler, bir mikrobiyal antiijene, örneğin *Borrelia* antiijenine veya *Ehrlichia*'ya yönelik bir antikoru saptamak veya mikrobiyal ilişkili bir hastalığa, örneğin Lyme hastalığına (*Borreliosis*) veya *Ehrlichiosis*'e tanı koymak için bir tane popülasyonunun, bir plakanın veya bir cihazın (örn. lateral akış cihazının) nasıl kullanılacağını gösteren bir talimat içerir. Bazı düzeneklerde kitler, saptanabilen Fc bağlanma molekülü,

antikora spesifik, saptanabilen antijen konjüгатını veya antijenik peptit konjüгатını ve test örneğini, saptama sisteminin (örn., bir lateral akış deney cihazı, mikrotiter plaka, analitik rotor) örnek yükleme bölgesine uygulanmadan önce herhangi bir sırada birleştirmeye yönelik talimatlar sunar. Bazı düzeneklerde kitler, saptanabilen antijen konjüгатı veya antijenik peptit konjüгатı, arzu edilen sinyal amplifikasyon düzeyine ulaşmak için saptanabilen Fc bağlanma molekülü ile belirli bir oranda bulunacak şekilde saptanabilen antijen konjüгатını veya antijenik peptit konjüгатını test örneği ile birleştirmeye yönelik talimatlar sağlar. Kitler ayrıca tamponların optimize edilmesi, çeşitli bileşenlerin (örn., Fc bağlanma molekülü, antijen veya antijenik peptit, test örneği) oranlarının optimize edilmesi ve karıştırma ve uygulama adımlarının sırasının optimize edilmesi (örn., uygulamadan önce tüm bileşenlerin karıştırılması, sadece bazı bileşenlerin karıştırılması ve diğerlerinin ayrıca uygulanması) için talimatlar sunabilir.

Burada açıklanan peptitler, peptitleri içeren kompozisyonlar ve cihazlar, kitler ve yöntemler, bir dizi avantaj sağlar. Örneğin bunlar, konu olan antikorların basit, ucuz, hızlı, duyarlı ve doğru bir şekilde saptanmasına ve anlamlı yanlış pozitif veya arka plan sinyalleri olmadan ilgili durumlara tanı konulmasına izin verir. Bu, çok düşük ve hatta başka şekilde saptanamayan düzeylerde antikorlar ihtiva eden örneklerin bile doğru ve hassas tanısına izin verir.

25

ÖRNEKLER

Örnek 1: Protein A, Lyme Hastalığına Spesifik bir Lateral Akış Deneyinde Antikörün Spesifik Saptanmasını Güçlendirir

Bir negatif örnek, bir Lyme-pozitif örnek ve düşük düzeyde bir Lyme-pozitif örnek test edilirken Protein A-CGC'nin (kolodyal altın konjüгатının) Lyme hastalığına spesifik bir lateral akış deneyine ilave edilmesinin etkisini belirlemek için testler yapıldı. Amaç, deneyin yeterli hassaslığını muhafaza ederken Protein A-CGC'nin potansiyel yanlış sinyal(ler) üzerindeki etkisini gözlemek ve sınıflandırmaktı. Bir Protein A-CGC negatif kontrolle ilişkili olarak çeşitli Protein A-CGC konsantrasyonları test edildi. Bu testte uygulanan lateral akış deneyi, Şekil 2 ve 3'te gösterilene benzerdir. Sonuçlar, Reaktivite skoru (daha yüksek bir sayının pozitif bir sonucu gösterdiği 0-5 skalası) ile gösterildiği gibi aşağıdaki Tablo 1'de gösterilmiştir.

15

Tablo 1: Test Sonuçlarının Özeti (Reaktivite Skoru)

Test Koşulları:	Düşük Poz WB 1:8 Seyrelti CB25 Ön Karışım	Düşük Poz WB 1:8 Seyrelti CB25 Ön Karışım	Dolly Poz WB 1:8 Seyrelti CB25 Ön Karışım	Dolly Poz WB 1:8 Seyrelti CB25 Ön Karışım	Neg_345 Plazma 1:8 Seyrelti CB25 Ön Karışım	Neg_345 Plazma 1:8 Seyrelti CB25 Ön Karışım
Kontrol: Protein A YOK	0	0,25	1,5	1,5	0,25	0,25
1X Protein A	3,5	3,5	3,5	3,5	0,5	0,5
1:2 Seyrelti Protein A	3,5	3,5	3,75	3,75	0,25	0,25
1:4 Seyrelti Protein A	1,25	1,25	2,25	2,25	0,25	0,25
1:8 Seyrelti Protein A	0,5	0,75	2	2	0,25	0,25

Tablo 1’de gösterildiği gibi Protein A-CGC ilavesi, test edilen tüm Lyme-pozitif örneklerin sinyalini amplifiye etti ve özellikle 'düşük' pozitif örneklerin saptanmasını sağladı. Protein A-CGC olmadan düşük pozitif örnekler, negatif örneklere denk bir Reaktivite skoru göstererek (~0.25 veya altı) saptanamaz durumdaydı. Buna karşılık Protein A-CGC’nin IX konsantrasyonda ve 1:2 seyreltide ilavesi, yaklaşık 3.5’lik bir Reaktivite skoru göstererek sinyali anlamlı düzeyde amplifiye etti. Böylelikle Protein A-CGC, bu Lyme hastalığına spesifik lateral akış deneyinde hedef antikorların saptanmasını anlamlı düzeyde geliştirir.

Ornek 2: Protein A, Stres Altındaki bir Biyolojik Örnekte Yapılan bir Lateral Akış Deneyinde Antikorum Spesifik Saptanmasını Güçlendirir

Protein A-CGC’nin (kolodyal altın konjüгатının) daha önce stres altına sokulmuş bir 48BSA (sığır serum albümini)/DAG IgG konjüгат karışımına ilave edilmesinin etkisini belirlemek için testler yapıldı. Konjüгат karışımı, bir inkübatör içinde 35°C’de 15 gün süreyle önceden stres altına sokuldu. Bu deney hem stres altında olan hem olmayan örnekleri Protein A-CGC varlığında ve yokluğunda test etti. Bu testte uygulanan lateral akış deneyi, Şekil 2 ve 3’te gösterilene benzerdir. Sonuçlar, Reaktivite skoru (daha yüksek bir sayının pozitif bir sonucu gösterdiği 0-5 skalası) ile gösterildiği gibi aşağıdaki Tablo 1’de gösterilmiştir. Sonuçlar, aşağıdaki Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Stres Altındaki Örneklerle Karşılık Stres Altında Olmayanlar için Test Sonuçlarının Özeti

Örnek	Pos_11-0483	Pos_11-0483	Neg_SCA30 2235HI	- Neg_SCA30 2235HI	-
Sıcaklık	2-8°C	35°C	2-8°C	35°C	
1. Gün	2,25	2,0	0	0	
15. Gün	2,5	0,75	0	0	
15. Gün + PA	2,75	1,25	0	0	

- 5 Yukarıdaki Tablo 2’de gösterildiği gibi Protein A-CGC’nin lateral akış deney karışımına ilavesi, 15. gün stresli (35°C) biyolojik örneğin sinyalini, Protein A-CGC yokluğuna göre, 0.75’ten 1.75’e yükselen bir Reaktivite skoru ile gösterildiği gibi amplifiye etti. 15. gün stressiz örnek (2-8°C) de 2.25’ten 2.75’e yükselen Reaktivite skoru ile
- 10 gösterildiği gibi Protein A-CGC ilavesinden bir parça etkilendi. Ayrıca negatif örnekler, Protein A-CGC ilavesi ile değişmedi.

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- WO 2011063235 A [0002] [0064]
- WO 2011063003 A [0003] [0064]
- US 2011136155 A [0003] [0101]
- WO 2013067524 A [0006]
- US 2013115634 A [0006] [0064]
- WO 2014059274 A [0007]
- US 20110136155 A [0064]
- US 20110124125 A [0064]

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

10

- **HONG W. et al.** J.ofMicrobiological Methods, November 2010, vol. 83 (2), 133-140 [0004]
- **FAN CHAO-MING et al.** Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases, May 2011, vol. 34 (5), 356-358 [0005]
- **SJOBRING et al.** J Biol Chem., 1991, vol. 266, 399-405 [0050]
- **LIAN et al.** Journal of Mol. Biol., 1992, vol. 228, 1219-1234 [0050]
- **DERRICK ; WIGLEY.** Journal of Mol. Biol., 1994, vol. 243, 906-918 [0050]
- Computational Molecular Biology. Oxford University Press, 1988 [0052]
- Biocomputing: Informatics And Genome Projects. Academic Press, 1993 [0052]
- Computer Analysis Of Sequence Data. Humana Press, 1994 [0052]
- **HEINJE.** Sequence Analysis In Molecular Biology. Academic Press, 1987 [0052]
- Sequence Analysis Primer.M Stockton Press, 1991 [0052]
- **DEVEREUX et al.** Nuc. Acids Res., 1984, vol. 12, 387 [0052]
- **ATSCHUL et al.** J Molec. Biol., 1990, vol. 215, 403 [0052]
- Adv. App. Math., 1981, vol. 2, 482-489 [0052]
- **SIKKEMA, J.W.D.** Amer. Biotech. Lab, 1989, vol. 7, 42 [0053]
- **ELIASSON et al.** J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, 4323-4327 [0053]
- **DAVIES et al.** Annual Rev. Biochem., 1990, vol. 59, 439-473 [0067]
- **HAUGLAND.** Handbook of Fluorescent Probes. Molec. Probes, Inc., Eugene OR, 2002 [0073]
- **HAUGLAND.** The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-. 2005 [0073]
- Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc [0082] [0090]

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1

A = Saptanabilen Oğ e ile Fc Baę lanma Moleköl ü Konjü gatı

5 B = Saptanabilen Oğ e ile İkinci Dedektör Konjü gatı

C = Konu Olan Antikor

D = Test Yüzeyi üzerinde İmmobilize Edilmiş Yakalama Oğ esi

E = Test Yüzeyi

10 **ŞEKİL 2**

F = Test Konjü gatı

G = Antijenik Peptit Dedektörü

H = BSA

I = Altın

15 J = Protein A/G

K = Fc Baę lanma Moleköl ü Konjü gatı

L = Örnek Portu

M = Absorbent

N = Kan ayırma pedi

20 O = Test (T) ve Kontrol (C) çizgileri ile nitroselüloz

P = Peptit Yakalama Oğ esi

R = Test Yakalama Çizgisi

S = Kontrol Yakalama

25 **ŞEKİL 3**

T = Örnek

U = Lyme IgG

V = Genel IgG

Y = Kontrol ve Amplifikasyon Konjüгатı

Z = Zaman

A1 = Akış Yönü

B1 = Antijen-Antikor-Antijen Sandviçi

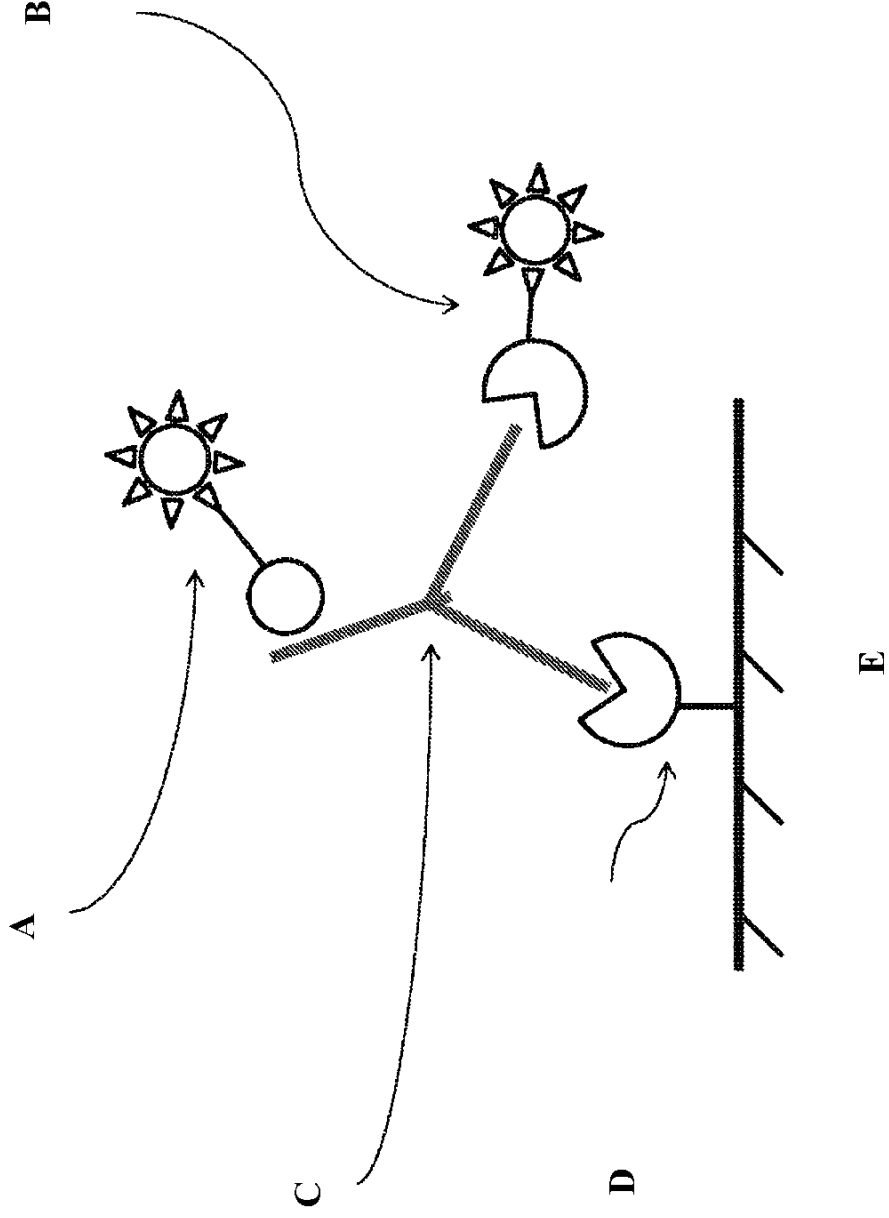
5

10

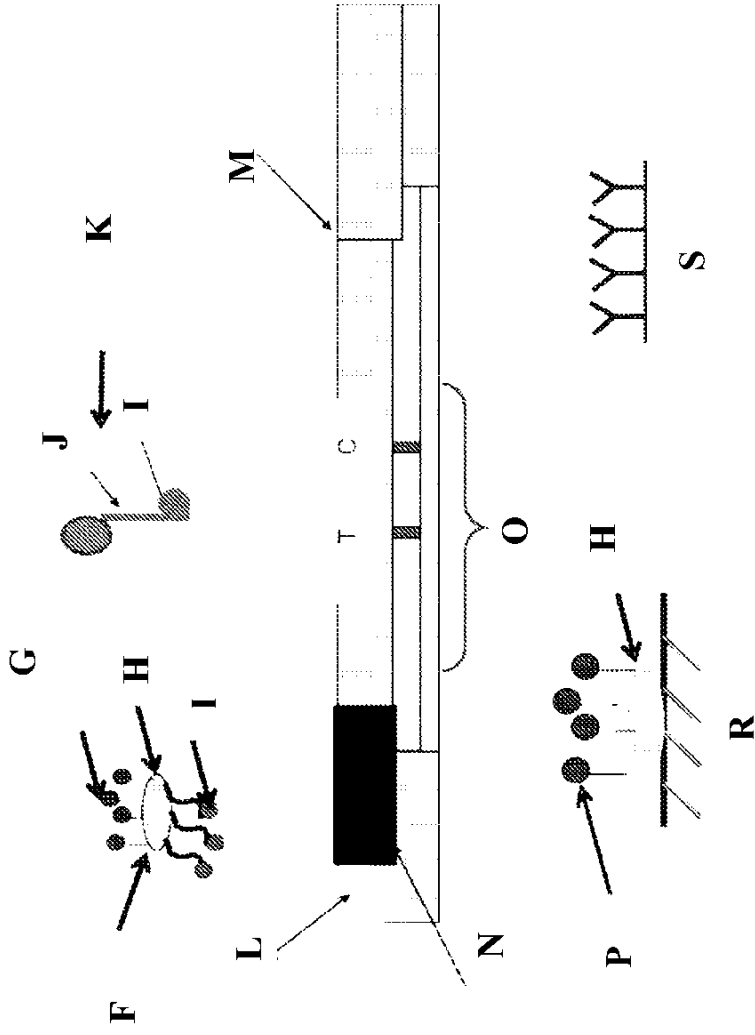
15

20

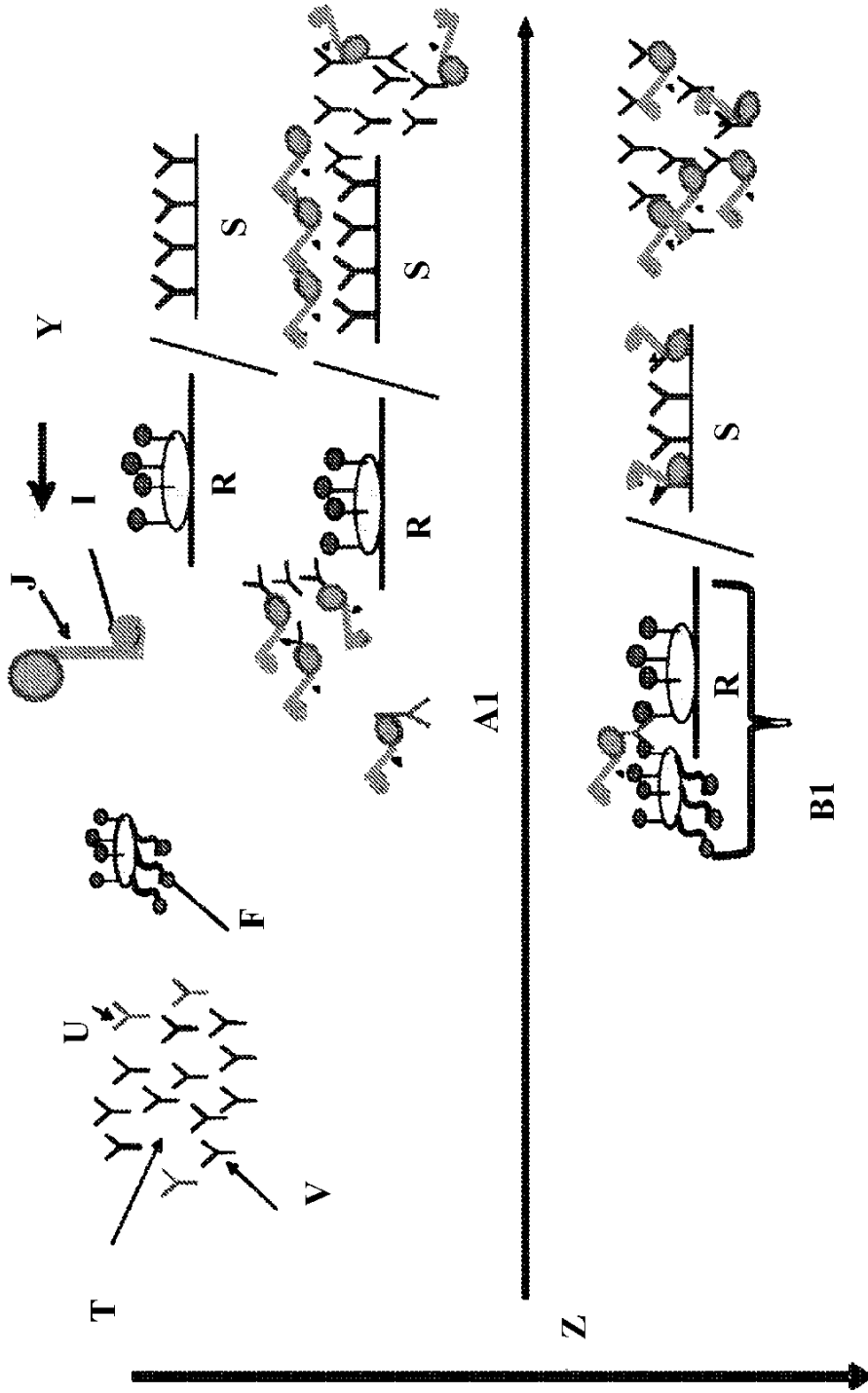
25



ŞEKİL 1



ŞEKİL 2



ŞEKİL 3