

P950 2356

61.088/SM

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

30753

126

K I V O N A T

Eljárás és reagenskészlet ^{szürke}szürkehályog-kifejlődés^{re} nagy rizikófaktorának kimutatására

Senju Pharmaceutical Co., Ltd., OSAKA, Japán

A bejelentés napja: 1995. 08. 09.

Elsőbbsége: 1994. 08. 10. (188451/1994) Japán

A találmány tárgya eljárás nagy rizikófaktor kimutatására, amely rizikófaktor szürkehályog kifejlődésére vezet. Az eljárásra az jellemző, hogy szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet határoznak meg emberi testnedvben immunoassay-vel, szemlencse-specifikus antigén alkalmazásával. A találmány tárgya továbbá reagenskészlet a szürkehályog kialakulására ^{hoz}vezető nagy rizikófaktor kimutatására, amely reagenskészlet szemlencse-specifikus antigént tartalmaz. A találmány szerinti kimutatási eljárás és a kimutatásra szolgáló reagenskészlet annak a nagy rizikófaktoroknak a ~~biztonságos, könnyű és gazdaságos~~ kimutatását teszi lehetővé, amely rizikófaktor következtében szürkehályog fejlődik ki olyan egyének esetén, akik szeme jelenleg látszatra normális, de lehetséges, hogy szürkehályogban fognak szenvedni a jövőben, továbbá a szürkehályog kezdeti szakaszában lévő betegek esetén. Ennek megfelelően az eljárást és a készletet előnyösen alkalmazhatják nemcsak a szürkehályog kimutatására, hanem az olyan esetek korai kimutatására is, amelyekben nagy a szürkehályog jövőbeni kifejlődésének a rizikófaktor, továbbá a szürkehályog korai kezelésére és megelőzésére.

Setchian

P9502356

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

30763

61.088/SM

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

Eljárás és reagenskészlet szürkehályog kifejlődés~~é~~ nagy rizikófaktorának kimuta-
tására

Senju Pharmaceutical Co., Ltd., OSAKA, Japán

Feltalálók: MITSUYOSHI Azuma, HYOGO, Japán,
ERI Inoue, HYOGO, Japán,
TAKAYUKI Oka, HYOGO, Japán

A bejelentés napja: 1995. 08. 09.

Elsőbbsége: 1994. 08. 10. (188451/1994) Japán

A találmány tárgya immunológiai eljárás szürkehályog jövőbeni kifejlődése nagy rizikófaktorának kimutatására és a detektálásra szolgáló reagenskészlet.

A szürkehályog olyan betegség, amelyben a szemlencse különféle okok miatt homályossá válik, és amely a szemlencse homályossága által előidézett látászavar formájában jelentkezik.

Az okok szerint a szürkehályogot (kataraktát) stagnáló katarakta, öregkori katarakta, szövődményes katarakta, baleseti katarakta, diabétiikus katarakta, sugárzási katarakta, stb. osztályokba sorolják, amelyek mindegyike a látás elvesztésével járó súlyos szembetegség. Az öregkori szürkehályog - amely e katarakták többségét képezi - oka még ismeretlen.

A szürkehályogot kezelték eddig különféle gyógyszerek adagolásával. Az ilyen gyógyszerek beadása azonban nem teljesen kielégítő, részben a szemlencse kifejezetten lassú metabolizmusa miatt. Ennek következtében a szürkehályog kezelése jelenleg a sebészeti beavatkozásokra korlátozódik. A sebészeti kezelést vagy úgy végzik, hogy a lencse magot és a lencsekérget eltávolítják a lencse membránján kívülre vagy úgy, hogy eltávolítják a szemből a teljes homályos szemlencsét. A sebészeti műtétek azonban gyakran járnak szövődményekkel és megterhelők a betegeknek nézve, mert a szaruhártya bemetszése és varrása elkerülhetetlen még akkor is, ha a műtétet korszerű sebészeti módszerek alkalmazásával végzik.

Az utóbbi években a szakirodalom arról számolt be, hogy a szürkehályog oka autoimmun jelenség lehet [(1) Angunawela, I.I., Immunology, 61, 363-368 (1987); (2) Niederkorn, J.Y., Immunology Today 8, (No. 11.) 332-333 (1987)].

Az előbbiektől Angunawela közleménye beszámolt arról, hogy a szemlencse - antigénnel szembeni autoantitestek termelődése szignifikánsan megnövekedik a kataraktás szemlencsés betegek szérumában és a cukorbeteg szérumában, továbbá arról, hogy immunglobulin mutatható ki a kataraktás szemlencsékben. Angunawela közleménye azonban nem ismerteti az antitest titer meghatározását, és a szakirodalom szerint eddig nem mutatták ki annak a lehetőségét, hogy az autoantitest megnövekedett titere a jövőben kifejlődő katarakta kockázatának indikátorává válik. Ezen felül Angunawela cikke nem ismerteti a szemlencse-fehérje antigénfajtájának specifikus azonosítását.

A fentiek alapján a találmány feladata eljárás és reagenskészlet szürkehályog (katarakta) kimutatására, amely eljárás és reagenskészlet alkalmas azon egyének kimutatására, akik szeme jelenleg látszatra normális, de szürkehályog fejlődhet ki rajta a jövőben. Az eljárás célja, hogy korán kimutassuk azon egyéneket, akik esetén nagy a kockázata annak, hogy szürkehályogban betegednek meg a jövőben, továbbá korai szakaszban mutassuk ki és korai szakaszban kezeljük a szürkehályogban szenvedő egyéneket.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy egy szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitest az emberi testnedvekben nagy rizikófaktor képez, amely következtében szürkehályog fejlődik ki olyan egyének esetén, akik szeme jelenleg látszatra normális, de lehetséges, hogy szürkehályogban fognak szenvedni a jövőben, és a nagy rizikófaktor kimutatása lehetővé teszi, hogy megtaláljuk azokat az egyéneket, akik esetén nagy a kockázata a szürkehályog jövőbeni kifejlődésének.

A találmány tárgya tehát eljárás nagy rizikófaktor kimutatására, amely rizikófaktor szürkehályog kifejlődéséhez vezet, azzal jellemezve, hogy szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet határozzunk meg humán testnedvben immunoassay-vel, szemlencse-specifikus antigén alkalmazásával.

A találmány tárgya különösen olyan, a fentiek szerinti kimutatási eljárás, amelyet a következő immunoassay lépések jellemeznek:

(a) humán testnedvben lévő, szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet reagáltatunk szemlencse-specifikus antigénnel, és

(b) meghatározzuk a szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet humán immunglobulinnal szembeni szekunder antitest alkalmazásával.

A találmány további tárgya reagenskészlet (kit) szürkehályog kifejlődéséhez vezető nagy rizikófaktor kimutatására, amely reagenskészlet szemlencse-specifikus antigént tartalmaz.

A találmány tárgya továbbá eljárás kataraktás betegek vagy egyének kimutatására, azzal jellemezve hogy a vizsgálandó egyének testnedvében lévő, a szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet immunanalízissel (immunoassay-vel), szemlencse-specifikus antigén alkalmazásával meghatározunk.

Az 1. ábra egy normál egyén és egy kataraktás beteg tipikus immunoblot eredményeit mutatja be.

A találmány szerint az immunanalízis ismert eljárás lehet, és nem korlátozzuk speciálisan, feltéve, hogy az alkalmas egy antigénnel szembeni specifikus antitest meghatározására antigén-antitest reakció alkalmazásával. Ezekre példák az olyan ismert eljárások mint az immunoblot (western blot) meghatározás, enzim immunoassay (ELISA), agglutinációs reakciók (például latex agglutináció és passzív hemagglutináció), radioimmunoassay és fluoreszcencia/fény emissziós immunoassay. A nagy érzékenység, valamint a könnyű és egyszerű műveletek szempontjából előnyös az immunoblot meghatározás, az enzim immunoassay, előnyösek továbbá az agglutinációs reakciók.

A találmány szerint felhasználandó szemlencse-specifikus antigén lehet lencse krisztallin (például α -krisztallin, β -krisztallin és γ -krisztallin), a lencse membrán-fehérjéje, ennek receptora, lencse homogenátum vagy epitheliocita homogenátum.

Mintaként felhasználandó humán testnedv bármelyik lehet, amennyiben lehetőség van a benne lévő autoantitest kimutatására, így például vér, plazma, szérum, ascites, nyirok, izületbeni (intraartikuláris) folyadék, nyál, könny, az ezekből nyert frakciók, valamint más biológiai forrásokból nyert folyékony komponensek, amelyek között előnyös a humán perifériális vérből származó szérum.

A találmány szerinti kimutatási eljárást a következőkben példák révén részletesen ismertetjük.

1. Immunoblot eljárás

Az immunoblot meghatározásra az jellemző, hogy humán testfolyadékban lévő, szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet reagáltatunk egy membránszűrőre felvitt (blotted) szemlencse-specifikus antigénnel, hozzáadunk humán immunglobulinnal szembeni, konjugált szekunder antitestet, és meghatározzuk az autoantitesthez kötött, konjugált szekunder antitestet.

1.1. Az antigén felvitele (blotting)

A szemlencse-specifikus antigént szokásos módszerrel vihetjük fel. A lencse-specifikus antigént például Laemmli [Laemmli et al., Nature, 227, 680-687, UK (1970)] eljárása szerint különíthetjük el, például nátrium-dodecilszulfát poli(akrilamid) gélelektroforézissel (SDS-PAGE). Ezután a kapott lencsespecifikus antigént Towbin és mtsai [Towbin H., Staehelin, T. and Gordon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 76, No. 9, pp: 4350-4354, USA (1979)] módszerével visszük fel blotting eljárással egy membránszűrőre. Membránszűrőként alkalmazhatunk nitrocellulóz szűrőt, Immobilon poli(vinilidén-difluorid)-ot (PVDF) és hasonlókat. A membránszűrőt, amelyre felvittük a lencsespecifikus antigént, felvágjuk például kb. 0,5 cm széles és 10 cm hosszú csíkokra, és humán testnedvvel reagáltatjuk.

A membránszűrőt, amelyre felvittük a szemlencse-specifikus antigént, előnyösen blokkoljuk a nemspecifikus adszorpció megelőzésére, ehhez alkalmas blokkoló oldatot használunk, úgymint puffert [pl. foszfát-pufferes sóoldatot (PBS) és Tris-puffer oldatot (TBS)], amely 1-3% borjú szérum albumint (BSA-t) tartalmaz.

1.2. Primer antitesttel végzett reakció

A következő reakciókat és mosási műveleteket előnyösen a kereskedelmi forgalomban kapható, így például Bio-Rad gyártmányú mini-inkubációs tálcákon végezzük. Előnyös, ha a tálca fedéllel van ellátva, mert így a tárolás és az inkubálás során

nem szennyeződik, és nem párolog el a víz belőle. A tálca és a fedél előnyösen akrilát műanyagból készül.

A vizsgálati mintaként felhasználandó humán testnedvet inkubáció előtt körülbelül 10-100-szorosára hígítjuk. A membránszűrőt, amelyre a blotting eljárás szerint felvittük az antigént, körülbelül 0,5-1,0 ml hígított mintával együtt inkubáljuk a tálcán, eközben minimálisra csökkentjük annak lehetőségét, hogy biológiailag káros anyagoknak legyen kitéve, így az inkubáció során a szemlencse-specifikus antigénnel szembeni, a vizsgálati mintában lévő autoantitest (primer antitest) reagál a szemlencse-specifikus antigénnel. Az inkubációt 4°C-37°C hőmérséklettartományban 1-24 órán át, előnyösen körülbelül 16 órán át végezzük. A reakció után a reakcióelegyet eltávolítjuk, és a membránszűrőt mossuk.

1.3. Szekunder antitesttel végzett reakció

A humán immunglobulinnal szembeni szekunder antitest egy olyan antitest, amely képes arra, hogy kötődjék egy meghatározandó antitesthez és enzimmel, radioaktív izotóppal, fluoreszcens anyaggal, fénykibocsátó anyaggal vagy más jelzőanyaggal konjugált antitest lehet, ezek között előnyös az enzimmel konjugált antitest. A szekunder antitestekre példa a kecske anti-humán immunglobulin, a nyúl anti-humán immunglobulin, a juh anti-humán immunglobulin, amelyek mindegyike jelzőanyaggal, úgymint peroxidázzal, alkálikus foszfatázzal vagy béta-galaktozidázzal van konjugálva. A szekunder antitestet hozzáadjuk az előző pont szerinti membránszűrőhöz és az elegyet 20°C-37°C-on körülbelül 1-2 órán át reagáltatjuk. A szekunder antitestet előnyösen 1000-5000-szeresre hígítjuk egy blokkoló oldattal a felhasználás előtt. Miután a reakció végbement, a reakcióelegyet eltávolítjuk és a membránszűrőt mossuk.

1.4. A szekunder antitest meghatározása

A szekunder antitestet ismert eljárással határozhatjuk meg a szekunder antitest jelzésére felhasznált jelzőanyag fajtája szerint. Ha enzimmel konjugált szekunder antitestet használunk, ismert színeképző szert adagolunk a megválasztott enzimnek megfelelően, és színeképződést idézünk elő. Ha például peroxidázt használunk, egy szubsztrátot, úgymint o-fenilén-diamint és ABTS-t [2,2'-azino-bisz(3'-etil-benzodiazolinszulfonsav)-at] és hidrogén-peroxidot használunk színeképző szerként; ha alkálikus foszfatazt alkalmazunk, egy szubsztrátot, úgymint p-nitro-fenil-foszforsavat használunk színeképző szerként; és ha béta-galaktozidázt alkalmazunk, egy szubsztrátot, úgymint o-(nitro-fenil)- β -D-galaktozidot és 4-metilumbelliferil- β -D-galaktozidot használunk színeképző szerként. Eredményként a mintában lévő autoantitest mennyiségétől függő színeképződést kapunk. Ha a színintenzitást összehasonlítjuk az ismert antitest titerű standard minta színintenzitásával, mennyiségileg határozhatjuk meg a vizsgálati mintában lévő autoantitestet.

2. Enzim immunoassay

Az enzim immunoassay-re az jellemző, hogy humán testnedvben lévő, szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet reagáltatunk szemlencse-specifikus antigénnel, amely szilárd fázison van rögzítve, hozzáadunk humán immunoglobulinnal szembeni, konjugált szekunder antitestet, és meghatározzuk az autoantisthez kötött konjugált szekunder antitest mennyiségét.

2.1. Antigén rögzítés (immobilizálás)

A szemlencse-specifikus antigént szilárd fázison rögzítjük. Szilárd fázis lehet például a poli(vinil-klorid), plisztirol, plietilén, polipropilén, poliészter, fluorgyanta, üveg és fém. A hordozó alakja például lemez, gyöngy, üreg(cell) és kémcső. Enzim immunoassay céljára előnyösek a kereskedelmi forgalomban kapható, ismert szilárd fázisok, úgymint a mikrotiter lemezek (például a 96-helyes mikrotiter lemezek).

Az antigént ismert eljárással rögzíthetjük. Eljárhatunk például úgy, hogy egy alkalmas pufferral készített antigén oldatot érintkezésbe hozzuk a szilárd fázissal, és állni hagyjuk 4-37°C-on 1-24 órán át, és így immobilizálódik az antigén. Ha poli(vinil-klorid) (PVC) mikrotiter lemezeket használunk, körülbelül 100 ng/hely antigént kötünk a lemezre. Előnyös, ha a nem adszorbeálódott részt blokkoljuk, blokkoló oldat, úgymint 1-3% BSA-t tartalmazó puffer [például foszfát pufferral készült konyhasóoldat (PBS) és Tris pufferral készült oldat (TBS)] alkalmazásával a nemspecifikus adszorpció megakadályozása céljából. A szilárd fázist alkalmas pufferoldattal mossuk. A felsorolt lépések révén az antigén immobilizálódik.

2.2. Primer antitesttel végzett reakció

A vizsgálati mintaként felhasználandó humán testnedvet körülbelül 100-5000-szeresére hígítjuk inkubáció előtt. A hígított mintát hozzáadjuk a fentiek szerint készített szilárd fázishoz és inkubáljuk, ezáltal a vizsgálati mintában lévő, a lencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitest (primer antitest) reagál a lencse-specifikus antigénnel. Az inkubációt 4-37°C-on, 1-24 órán át, előnyösen 16 órán át végezzük. Miután a reakció végbement, a reakcióelegyet eltávolítjuk, és a szilárd fázist mossuk.

2.3. Szekunder antitesttel végzett reakció

A humán immunglobulinnal szembeni szekunder antitest képes a meghatározandó autoantitesthez kötődni, és olyan szekunder antitesteket alkalmazhatunk, amelyek enzimmel, radioaktív izotóppal, fluoreszcens anyaggal, fénykibocsátó anyaggal vagy más jelzőanyaggal vannak konjugálva, ezek között is előnyösek az enzimekhez kapcsolt (konjugált) szekunder antitestek. A szekunder antitestekre például a kecske anti-humán immunglobulin, a nyúl anti-humán immunglobulin, a juh anti-humán immunglobulin, amelyek mindegyike jelzőanyaggal, úgymint peroxidázzal, alkálikus foszfatázzal és béta-galaktozidázzal van konjugálva. A szekunder antitestet hozzáadjuk a szilárd fázishoz, és az elegyet 4°C-37°C-on körülbelül 1-2 órán át rea-

gáltatjuk. A szekunder antitestet előnyösen 1000-5000-szeresre hígítjuk, majd reakcióba visszük. Miután a reakció végbement, a reakcióelegyet eltávolítjuk és a szilárd fázist mossuk.

2.4. A szekunder antitest meghatározása

A szekunder antitestet ismert eljárással határozhatjuk meg a szekunder antitest jelzésére felhasznált jelzőanyag fajtája szerint. Ha enzimmel konjugált szekunder antitestet használunk, ismert színeképző szert adagolunk a megválasztott enzimnek megfelelően, és színeképződést idézünk elő. Ha például peroxidázt használunk, egy szubsztrátot, úgymint o-fenilén-diamint és ABTS-t [2,2'-azino-bisz(3'-etil-benzodiazolinszulfonsav)-at] és hidrogén-peroxidot használunk színeképző szerként; ha alkálikus foszfatazt alkalmazunk, egy szubsztrátot, úgymint p-nitro-fenil-foszforsavat használunk színeképző szerként; és ha béta-galaktozidázt alkalmazunk, egy szubsztrátot, úgymint o-(nitro-fenil)- β -D-galaktozidot és 4-metilumbelliferil- β -D-galaktozidot használunk színeképző szerként. Eredményként a mintában lévő autoantitest mennyiségétől függő színeképződést kapunk. A reakcióelegy abszorbanciáját spektrofotométerrel vagy fluorofotométerrel határozzuk meg, amely abszorbancia alapján az antitestet mennyiségileg meghatározzuk a vizsgálati mintában.

3. Agglutinációs reakciók

Az agglutinációs reakción alapuló immunmeghatározás során szemlencse-specifikus antigénnel kapcsolt hordozórészecskéket alkalmazunk. Hordozórészecske lehet például a polisztírol latex, kaolin, bentonit, szénpor, továbbá birka, csirke eritrocita és hasonló. Az antigént ismert eljárással kötjük a hordozórészecskéhez. Például kapcsolószereket, úgymint csersavat, glutáraldehidet, biszazobenzidint, karbodiimideket, kinonokat és króm-kloridot alkalmazunk vagy fizikai adszorpciót végzünk.

Az agglutanációs reakciót a latex agglutinációra és a passzív agglutinációra szokásosan alkalmazott eljárás szerint végezzük. Például sorozatban hígított vizsgálati mintát (például humán perifériális vérből származó szérumot) helyezünk egy mikrolemez vájataiba, elegyítjük a fenti, szemlencse-specifikus antigénnel kapcsolt hordozórészecskével, majd 1-2 órán át állni hagyjuk, hogy végbemenjen az agglutináció. Az agglutinációt összehasonlítjuk az ismert antitest titerű minta agglutinációjával, így meghatározzuk a mintában lévő autoantitest mennyiségét.

A találmány szerinti reagenskészlet szemlencse-specifikus antigént tartalmaz. A találmány szerinti reagenskészlet előnyösen (a) szemlencse-specifikus antigént, (b) humán immunglobulinnal szembeni szekunder antitestet és (c) a szekunder antitest meghatározására színeképző szert tartalmaz. Az (a)-(c) komponenseket tartalmazó reagenskészletet enzim immunoassay (ELISA) vagy immunoblot meghatározás céljára használjuk. Az enzim immunoassay reagenskészlet esetén a szemlencse-specifikus antigént előzetesen rögzíthetjük szilárd fázison vagy immobilizálhatjuk szilárd fázison a felhasználás során. Ebben az esetben a reagenskészlet tartalmazhat az antigén immobilizálására szolgáló szilárd fázist. Az immunoblot meghatározásra szolgáló reagenskészlet esetén a szemlencse-specifikus antigént a blotting eljárás szerint felvihetjük előzetesen a membránszűrőre vagy felvihetjük a membránszűrőre a használat során. Ebben az esetben a reagenskészlet tartalmazhat egy membránszűrőt az antigén felvitelére. Előnyösen olyan membránszűrőt használunk, amelyre az antigént már felvitték. Az agglutinációs reakcióra szolgáló reagenskészlet szemlencse-specifikus antigénnel kapcsolt hordozórészecskéket tartalmaz. A fent említett konstrukciók mellett a reagenskészlet tartalmazhat ismert antitest titerű standard vizsgálati mintát, puffert, hígítószert, mosóoldatot, reakciót leállító vegyületet (terminátort) és hasonlókat. Mindegyik fent említett komponenst előállíthatjuk szuszpenzió, oldat vagy liofilizált termék formájában.

A találmány szerinti kimutatási eljárás, valamint a kimutatásra szolgáló reagenskészlet annak a nagy rizikófaktornak a biztonságos, egyszerű és gazdaságos kimutatását teszi lehetővé testnedvekben lévő, szemlencse-specifikus antigén elleni autoantitest mennyiségi meghatározásával, amely faktor következtében szürkehályog fejlődik ki olyan egyének esetén, akik szeme jelenleg látszatra normális, de lehetséges, hogy szürkehályogban fognak szenvedni a jövőben, nem szólva a szürkehályog kezdeti szakaszában szenvedő betegekről.

Közelebbről, szemlencse-specifikus antigénnel, úgymint krisztallinnal és membrán komponenssel szembeni autoantitestet határozhatunk meg minőségileg az immunoblot meghatározáson alapuló kimutatási eljárással. Ezen felül mennyiségileg határozhatunk meg szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet az enzim immunoassay vagy az agglutinációs reakción alapuló kimutatási eljárással. Ennélfogva az immunoblot meghatározás és az enzim immunoassay vagy az agglutinációs reakció kombinációja lencsespecifikus antigénnel szembeni autoantitest minőségi és mennyiségi meghatározását eredményezi, és így meghatározható a szürkehályog előrehaladását megelőző kezelési eljárás.

A találmányt a példákon keresztül mutatjuk be részletesebben, a találmány kivételét pedig a kísérleti példákon keresztül mutatjuk be. A példák céljra csupán a bemutatás, így azok a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

1. példa

Humán szemlencse homogenizátumot készítünk úgy, hogy humán szemlencsét és puffert homogenizálunk egy homogenizátorban, majd ezt az anyagot használjuk fel humán lencsespecifikus antigénként.

A humán lencsespecifikus antigént (10 µg/ml) kalcium és magnézium nélküli Dulbeco foszfátpufferral készült sóoldattal hígítjuk, és 25 µl-enként adagoljuk egy 96-helyes mikrotiter lemez mindegyik bemélyedésébe. Ezután ehhez 25 µl nátrium-

-hidrogén-karbonát oldatot - melynek pH-ja 9,3 és amely 5 mM dinátrium-etilén-di-amin-tetraacetátot tartalmaz - adagolunk. A lemezt rázzuk, majd egy éjjelen át 4°C-on állni hagyjuk, hogy az antigén adszorbeálódhasson a mélyedések aljának felületére. Az antigén oldatot eltávolítjuk, és blokkoló oldatot adagolunk mindegyik mélyedésbe, ez a blokkoló oldat minden esetben 100 µl foszfátpufferral készült sóoldat (PBS, pH = 7,0), amely 1% BSA-t tartalmaz. A lemezt 4°C-on 1 órán át hagyjuk állni, hogy befedje a mélyedések alját (antigén-nemadszorbeált rész), és az oldatot eltávolítjuk.

100 µl higított humán szérumot adagolunk mindegyik mélyedésbe, és az elegyet 4°C-on egy éjjelen át reagáltatjuk. A higított szérumot úgy készítjük, hogy humán szérumot blokkoló oldattal 250-szeresére, 750-szeresére vagy 2250-szeresére higítunk. Miután a reakció végbement, a higított szérumot eltávolítjuk, és a mélyedéseket háromszor mossuk PBS-sel. Alkálikus foszfátázzal konjugált szekunder antitestet (alkálikus foszfátázzal konjugált kecske anti-humán immunglobulin, a Bio-Rad terméke) 2500-szorosra higítunk blokkoló oldattal, és 100-100 µl-t adagolunk a mélyedésekbe. Az elegyet 37°C-on 2 órán át reagáltatjuk. Miután a reakció végbement, a lemezt négyszer vagy ötször mossuk PBS-sel.

A PBS-sel végzett utolsó mosás után 100 µl szubsztrát oldatot adunk minden mélyedésbe, és az elegyet 30 percen át reagáltatjuk. A szubsztrát oldatot úgy készítjük, hogy dietanol-amin puffert ötszörösére higítunk desztillált vízzel és ebben p-nitro-fenil-foszforsavat oldunk. A p-nitro-fenil-foszforsav 5 mg-os tablettá formájában van (a Bio-Rad által gyártott alkálikus foszfátáz szubsztrát kit). Miután a reakció végbement, 405 nm-en meghatározzuk az abszorbanciát lemezleolvasó (a Labsystems gyártmánya) alkalmazásával.

2. példa

Az 1. példában leírt módon készítünk humán szemlencse homogenizátumot és használjuk fel azt lencsespecifikus antigénként. Laemmli eljárása szerint [Laemmli et al., Nature, 227, 680-687, UK (1970)] a lencsespecifikus antigént egydimenziós nátrium-dodecil-szulfát poli(akril-amid) gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választjuk el. Ezután a kinyert szemlencse-specifius antigént a blotting eljárás szerint nitro-cellulóz szűrőre vesszük fel Towbin és munkatársai eljárása szerint [Towbin H., Staehelin, T. and Gordon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, No. 9., 4350-4354 USA (1979)]. Ezt a membránszűrőt 0,5 cm széles és 10 cm hosszú csíkokra vágjuk fel.

Az antigént tartalmazó (antigén-blotted) membránszűrő csíkokat elhelyezzük egy eldobható 8-soros tálca (Bio-Rad gyártmány) egy-egy sorába. Ehhez 2 ml Tris-pufferoldatot adunk, amely 2% BSA-t tartalmaz és a lemezt szobahőmérsékleten állni hagyjuk két órán át, hogy be legyen borítva a membránszűrő felülete (antigén által nem adszorbeált rész), majd az oldatot eltávolítjuk. A lemezt 5 percig mossuk TTBS-sel (0,05% Tween 20-at tartalmazó TBS). A mosási műveletet kétszer megismételjük. A humán szérumot úgy használjuk fel, hogy a reakciót megelőzően 1% BSA-t tartalmazó TTBS-sel 100-szorosára hígítjuk.

1 ml hígított humán szérumot adagolunk a tálca mindegyik sorába és ezzel a membránszűrőt 4°C-on egy éjjelen át reagáltatjuk. A reakciót követően eltávolítjuk a hígított szérumot, és a membránszűrőt 5 percig mossuk TTBS-sel. Ezután a mosást kétszer megismételjük. Alkálikus foszfáttal konjugált szekunder antitestet (alkálikus foszfáttal konjugált kecske anti-humán immunglobulin, a Bio-Rad terméke) 2500-szorosra hígítunk 1% BSA-t tartalmazó TTBS-sel, és 1 ml-enként hozzáadjuk a membránszűrőhöz. A membránszűrőt 2 órán át reagáltatjuk szobahőmérsékleten. Miután a reakció befejeződött, a membránszűrőt kétszer mossuk TTBS-sel, 5-5 percig mindkét alkalommal, majd kétszer mossuk TBS-sel 5-5 percig.

Alkálikus foszfatáz színeképző reagenskészletet (a Bio-Rad gyártmánya) használunk a színeképzésre. 1 ml színeképző oldatot adagolunk a tálca mindegyik sorába, hogy kifejlesszük a membránszűrő színét (kékes bíbor), majd desztillált vizet adagolunk hozzá, hogy a reakciót leállítsuk. A színeképző oldatot úgy készítjük, hogy BCIP-t (5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát) és NBT-t (nitrokék tetrazólium) színeképző pufferral elegyítünk.

1. Kísérleti példa: Szemlencse fehérjére specifikus antitest meghatározása humán szérumban

Vizsgálati módszer

5-5 ml vérmintát veszünk normál kísérleti alanyoktól (8 férfi, 43-65 évesek) és szürkehályogban szenvedő 10 betegtől (8 nő és 2 férfi, 41-78 évesek). Normál alanyokon olyanokat értünk, akiknél nem jelentkeznek a szürkehályog tünetei. A vérmintákból nyert szérumot 250-szeresre hígítjuk 1% BSA-t tartalmazó PBS-sel, majd az 1. példában leírtak szerint reagáltatjuk, és meghatározzuk az abszorbanciát 405 nm-en, így meghatározzuk a szemlencse-fehérjével szembeni antitest mennyiségét. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

Az 1. kísérleti példa mérési eredményei

Szám	Kor	Nem	Normál alany abszorbancia (A405)
1	65	férfi	0,356
2	44	férfi	0,273
3	64	férfi	0,205
4	46	férfi	0,250
5	56	férfi	0,204
6	59	férfi	0,396
7	49	férfi	0,354
8	43	férfi	0,440

1. táblázat folytatása

Szám	Kor	Nem	Szürkehályogos beteg abszorbancia (A405)
1	71	férfi	0,982
2	65	nő	0,723
3	73	nő	0,556
4	63	nő	0,666
5	41	nő	0,504
6	78	nő	0,996
7	63	nő	0,980
8	56	nő	0,739
9	58	férfi	0,946
10	73	nő	0,720

Megjegyzés: A táblázatban foglalt adatokat úgy kapjuk, hogy az abszorbanciát 405 nm-en mérjük, és a szérumot 250-szeres hígításban használjuk.

Vizsgálati eredmények

Amint azt az 1. táblázat mutatja, mind a normál kísérleti alanyok, mind a szürkehályogban szenvedő páciensek széruma tartalmaz szemlencse-fehérjével szembeni antitesteket. Mind a 10, szürkehályogban szenvedő páciens széruma azonban magasabb értékeket mutat a normál személyekéhez képest.

Az 1. táblázat eredményeiből az látható, hogy a szemlencse-fehérjével szembeni antitest jelen van normál egyének esetén is. Az antitest mennyisége a szürkehályog kifejlődésével növekszik. Ennek megfelelően az antitest nagy kockázati tényező (rizikófaktor), amely szürkehályog kifejlődésére vezet azoknál, akik szeme jelenleg normálisnak látszik, de a jövőben esetleg szürkehályogban fognak szenvedni.

Az 1. táblázat eredményei alapján azokat a személyeket, akiknek a 250-szeres higítású széruma 0,5 fölötti abszorbancia értéket mutatott, pozitívaknak minősítünk, és azokat, akik esetén az abszorbancia 0,5 érték alatt van, negatívaknak. A minősítési eredményeket a 2. táblázatban foglaljuk össze, melyben mindegyik szám a kísérleti alanyok számát jelenti.

2. táblázat

A vizsgált személyek minősítése

	Pozitív	Negatív	Összes
Normál személy	0	8	8
Szürkehályogos beteg	10	0	10
Összes	10	8	18

2. Kísérleti példa: Az α -, β - és γ -krisztallinra specifikus antitestek meghatározása humán szérumban

Vizsgálati módszer

Az 1. kísérleti példában leírtak szerint járunk el, vért veszünk normál kísérleti alanyoktól (8 férfi, 43-65 évesek) és szürkehályogban szenvedő 10 betegtől (8 nő és 2 férfi, 41-78 évesek). A második példában leírt módszer szerint azt vizsgáltuk meg, hogy a szemlencse-fehérjével szembeni antitest, amely az 1. kísérleti példa szerint növekedést mutatott, krisztallinnal szembeni antitest volt.

Vizsgálati eredmények

Egy normál egyén és egy szürkehályogban szenvedő beteg tipikus immunoblot eredményét mutatja be az 1. ábra. Az ábrán bemutatott eredményekből nyilvánvaló, hogy az α -, γ - és β -krisztallinnal szembeni antitestek jelen vannak mind a normál személy, mind a kataraktás beteg szérumában. A sötétebb szín, ami a szürke-

hályogban szenvedő beteg krisztallinsávjainál a normál személyéhez képest kialakult, utal az α -, γ - és β -krisztallinokkal szembeni magasabb antitest titerre a kataraktás beteg szérumában, amint azt az 1. kísérleti példa szerint tapasztaltuk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy mind a kataraktás betegekben, mind a normál egyé-
nekben jelen vannak α -, γ - és β -krisztallinokkal szembeni antitestek. Az ilyen antites-
tek nagy kockázati tényezőt (rizikófaktort) képviselnek, amely szürkehályog kifejlődé-
sére vezet azoknál, akik szeme jelenleg normálisnak látszik, de a jövőben esetleg
szürkehályogban fognak szenvedni.

A találmány szerinti kimutatási eljárás és a kimutatásra szolgáló reagenskész-
let annak a nagy rizikófaktornak a biztonságos, könnyű és gazdaságos kimutatását
teszi lehetővé, amely rizikófaktor következtében szürkehályog fejlődik ki olyan egyé-
nek esetén, akik szeme jelenleg látszatra normális, de lehetséges, hogy szürkehá-
lyogban fognak szenvedni a jövőben, továbbá a szürkehályog kezdeti szakaszában
lévő betegek esetén. Ennek megfelelően az eljárást és a készletet előnyösen alkal-
mazhatjuk nemcsak a szürkehályog kimutatására, hanem az olyan esetek korai ki-
mutatására is, amelyekben nagy a szürkehályog jövőbeni kifejlődésének a rizikó-
faktora, továbbá a szürkehályog korai kezelésére és megelőzésére. Ez a dektálás
továbbá felvehető a jelenlegi hematológiai ellenőrzési vizsgálatok közé.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás nagy rizikófaktor kimutatására, amely rizikófaktor szürkehályog kifejlődéséhez vezet, azzal jellemezve, hogy szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet határozunk meg humán testnedvben immunoassay-vel, szemlencse-specifikus antigén alkalmazásával.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az immunoassay a következő lépsekből áll:

(a) humán testnedvben lévő, szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet reagáltatunk szemlencse-specifikus antigénnel, és

(b) meghatározzuk a szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet humán immunglobulinnal szembeni szekunder antitest alkalmazásával.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az immunoassay a következő lépésekből áll:

(a) humán testnedvben lévő, szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet reagáltatunk szilárd fázison rögzített szemlencse-specifikus antigénnel,

(b) humán immunglobulinnal szembeni, konjugált szekunder antitestet adunk hozzá, és

(c) meghatározzuk az autoantitesthez kötött konjugált szekunder antitest mennyiségét.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az immunosassay a következő lépésekből áll:

(a) humán testnedvben lévő, szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet reagáltatunk membránszűrőre blotting eljárás szerint felvitt szemlencse-specifikus antigénnel,

(b) humán immunglobulinnal szembeni, konjugált szekunder antitestet adunk hozzá, és

(c) meghatározzuk az autoantitesthez kötött konjugált szekunder antitest mennyiségét.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az immunoassay a következő lépésekből áll:

(a) humán testnedvben lévő, szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet reagáltatunk hordozórészecskéken rögzített szemlencse-specifikus antigénnel, és

(b) meghatározzuk a szemlencse-specifikus antigén és az autoantitest közötti reakció által okozott agglutinációt.

6. Reagenskészlet szürkehályog kifejlődéséhez vezető nagy rizikófaktor kimutatására, amely reagenskészlet szemlencse-specifikus antigént tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti reagenskészlet, azzal jellemezve, hogy

(a) szemlencse-specifikus antigént,

(b) humán immunglobulinnal szembeni konjugált szekunder antitestet, és

(c) a konjugált szekunder antitest mennyiségi meghatározására színeképző szert tartalmaz.

8. A 7. igénypont szerinti reagenskészlet, azzal jellemezve, hogy a szemlencse-specifikus antigént szilárd fázison rögzítve tartalmazza.

9. A 7. igénypont szerinti reagenskészlet, azzal jellemezve, hogy a szemlencse-specifikus antigént a blotting eljárás szerint membránszűrőre felvive tartalmazza.

10. A 7. igénypont szerinti reagenskészlet, azzal jellemezve, hogy a szemlencse-specifikus antigént hordozórészecskékhez kötve tartalmazza.

11. Eljárás kataraktás betegek és olyan egyének kimutatására, akiknél kifejlődhet katarakta, azzal jellemezve, hogy szemlencse-specifikus antigénnel szembeni autoantitestet határozzunk meg a vizsgálandó egyén testnedvében immunoassay-vel, szemlencse-specifikus antigén alkalmazásával.

20 old.
1 rajz

21 old.

A meghatalmazott



Somlai Mária

szabadalmi ügyvivő

az S.B.U. & K. Nemzetközi

Szabadalmi Iroda tagja

H-1062 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: 34-24-980, Fax: 34-24-923

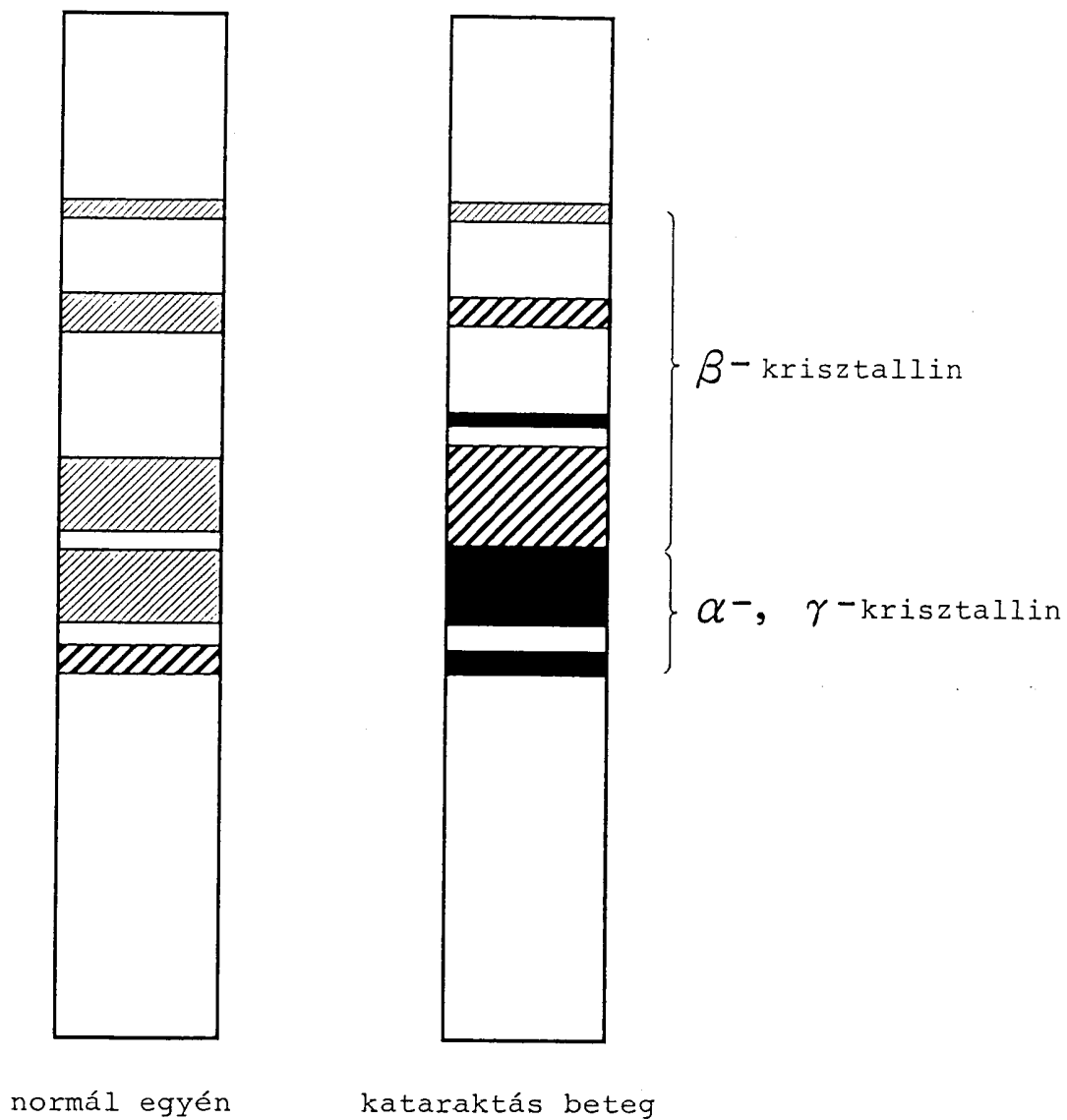
Tóth

61.088/SM

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

30755

1. ÁBRA




Somlai Mária
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-840. Fax: 34-24-323