

3145/92

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

2370

/as

64623

56.717/SZE

KIVONAT

Protein-nukleinsav minták és az azt tartalmazó immunesszék
CHIRON CORPORATION, EMERVILLE, Californai,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1991. 05. 06.

Elsőbbsége: 1990. 05. 04. (07/519,212),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/02925

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/17442

A találmány egy aspektusában különböző protein/nukleinsav hibrid próbák kerülnek leírásra, melyek immunvizsgálatokban a detektálható jel amplifikálására használhatók. A protein rész képes akár antitestként, akár antigénként funkcionálni. A nukleinsav rész jel amplifikálóként szolgál. Egy másik megvalósulásban számos immunvizsgálati detektálható jel amplifikálási módszer kerül leírásra, melyekben hibrid próbák és ezekkel összefüggő polinukleotid próbák kerülnek alkalmazásra.

MS
Jellemezés a következők szerint

5115/92

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

2370 /93

56.717/SZE

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

64622

"A"

NSU-5-

GOIN 33/533

CA2Q 1/68

Protein-nukleinsav minták és az azt tartalmazó
immunesszék

Emeryville,

CHIRON CORPORATION; ~~EMERVILLE~~, California,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltaláló:

URDEA Michael S. ALAMO, California,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1991. 05. 06.

Elsőbbsége: 1990. 05. 04. (07/519,212),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/02925

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/17442

Az alábbiakban megadjuk a találmány leírását.

Technikai rész

A találmány tárgya általánosan az immunológia és a nukleinsav kémia tárgykörébe tartozik. Specifikusabban, a nukleinsav hibridizációnak az immunvizsgálatokban detektálható jel amplifikálásához való felhasználására vonatkozik.

A következőkben megadjuk a találmány tudományos háttérét.

A nukleinsav hibridizációk napjainkban a genetikai kutatásban, az orvosbiológiai kutatásban és a klinikai diagnosztikában használatosak DNS, RNS és/vagy más anyagok heterogén elegyeiben jelenlevő bizonyos nukleotid szekvenciák detektálására és mennyiségük mérésére. A nukleinsav hibridizációs alapvizsgálatban egyszáлу analit nukleinsavat /akár DNS-at, akár RNS-at/ hibridizáltatnak közvetlen vagy közvetett módon egy jelölt nukleinsav próbához és a jelölést tartalmazó duplexek mennyiségét mérik. Radioaktív és nem radioaktív jelölések egyaránt használatosak.

Az alapvizsgálat azonban nem elég érzékeny. Ha az analit alacsony kópia számban, vagy kis koncentrációban van jelen, a jel nem különíthető el a háttér zajtól. Az alapséma különböző változatait fejlesztették ki azért, hogy elősegítsék a cél duplexek idegen anyagtól való elkülöni-

tését és/vagy amplifikálják az analit szekvenciákat, a detektálás elősegítése céljából. Ezek a változatok azonban általában összetett és időigényes eljárások, erős a háttér, kicsi az érzékenység és bonyolult a mennyiségi meghatározás. Ezen változatok általános értékelése a 89/03891-es számú International Patent Publication-ben található.

Az immunvizsgálatokat általánosan használják a genetikai kutatásban, az orvosbiológiai kutatásban és a klinikai diagnosztikában bizonyos, a vérminták heterogén keverékében, sejtkivonatokban és más anyagokban jelenlevő antigén epitópok detektálására és mennyiségi meghatározására. Egy alap immunvizsgálat magába foglalja egy akár monoklonális, akár poliklonális antitestnek egy cél antigénhez való specifikus kötődését és egy a reakció detektálására szolgáló módszert. Ilyen módszert foglalnak magukba, különböző direkt, indirekt és szendvics immunvizsgálatokat tartalmazó különböző eljárások. Azonban az esszenciális antigén/antitest kölcsönhatás detektálásának érzékenysége többnyire a nukleinsav hibridizációknál fentebb leirtakkal megegyező problémákat mutat.

Különböző technikák, mint pl. a radioimmunvizsgálat, immunperoxidáz és ELISA használatosak jelenleg az immunvizsgálatokhoz. A radioimmunvizsgálatoknak azonban az a hátrányuk, hogy veszélyes és a környezetre káros reagensek használatát igénylik. Az immunperoxidáz és az ELISA módszernek pedig az a hátránya, hogy alacsony a jel/zaj arány és

limitált a jel amplifikáció.

A találmány egy elsődleges tárgya jel amplifikációs módszerek biztosítása az immunvizsgálatokhoz, olyan egyedi polinukleotid molekulák felhasználásával, melyek hasznosnak bizonyultak a nukleinsav hibridizációs vizsgálatokban. Ezek az amplifikáló tesztek jól reprodukálható jel növekedést és jól reprodukálható jel/zaj arányt biztosítanak, mennyiségi meghatározásra alkalmasak és reprodukálhatóak, továbbá képesek az alacsony koncentrációban jelenlevő analit antigénnel specifikusan kötődni, valamint "univerzális" nukleinsav marker résszel stabil komplexeket képezni.

Az általánosan ismert 1989 szept. 19 -én kiadott 4,868,105 számú US szabadalom , melynek leírását a hivatkozás révén a találmányba építettük, leír egy oldat fázisu hibridizációs szendvics vizsgálatot, melyben az analit nukleinsavat egy "jelölő próbához" és egy "befogó próbához" hibridizáltatják. A próba - analit komplexet hibridizációval szilárd támasztékhoz kötik. Ez lehetővé teszi az analit oligonukleotid szilárd fázisu komplexként való eltávolítását az oldatból, ezáltal koncentrálva az analitot, megkönnyítve más reagesektől való elválasztását és elősegítve későbbi detektálását.

A WO 90/13667 számú, 1990 nov. 15-én közzétett, általánosan ismert PCT alkalmazás lineáris és elágazó , két doménből álló, multimer polinukleotid próbákat ír le, valamint ezen próbákat a nukleinsav hibridizációs vizsgálá-

tokban jel amplifikálókként felhasználó módszereket. Az első domén komplementer egy kérdéses egyszáлу oligonukleotid szekvenciával és a második domén több egyszáлу oligonukleotid alegységből áll, melyek egy egyszáлу jelölt oligonukleotiddal komplementerek.

Az általánosan ismert idevonatkozó PCT/US91/00213-as számu PCT Alkalmazás olyan polinukleotid próbákat ír le, melyek három doménnel rendelkeznek, valamint ezen próbák nukleinsav hibridizációs vizsgálatokban jel amplifikálókként való használatának módszereit. Az első domén komplementer a kérdéses egyszáлу oligonukleotid szekvenciával, a második domén képes egy bakteriális fág DNS-dependens RNS polimeráz enzim aktivitásának promótereként, a harmadik domén pedig a polimeráz aktivitás transzkripciós templatjaként működni.

Protein/DNS hibrid molekulákat alkalmaznak nukleinsav hibridizációs vizsgálatok próbáiként, ahol a protein egység jelölő komponensként működik /Czichos, J., et.al., Nucl. Acids Res. /1989/ 17:1563; U.S. Patent No. 4,873,187; U.S. Patent No. 4,737,454./.

Protein/DNS hibrid molekulákat alkalmaznak próbaként immunvizsgálatokban is. A 4,692,509-es számu US szabadalom leír egy radioaktív jelölésű hibrid próbát, mely egy proteint és egy kovalensen kötött radiokativ oligonukleotidot tartalmaz. A radiokativ részt használják a fehérje rész jelenlétének jelzésére egy biológiai vizsgálatban.

A 154 884 számú E.P.A. egy protein/DNS hibrid molekulát ír le, melyben a protein rész egy célproteint ismer fel specifikusan, és a nukleinsav rész a jelölő szerepét tölti be.

A következőkben megadjuk a találmány összefoglalását.

A találmány egyik aspektusa egy polipeptid/polinukleotid hibrid molekuláris próba, mely a detektálható jel amplifikálójaként használható az immunvizsgálatokban. Egy megvalósulásban a "polimeráz próba" három domént tartalmaz:

/a/ egy első domént /A/, mely egy polipeptid és egy ismert antigénre specifikus antitestként funkcionál;

/b/ egy második domént /B/, mely egy kétszálu polidezoxiribonukleotid, mely egy DNS-függő RNS polimeráz enzim aktivitás promótereként képes funkcionálni; és

/c/ egy harmadik domént /C/, mely vagy egyszálu vagy kétszálu és mely a második doménnel oly módon szomszédos, hogy a harmadik domén képes a második domén promóter aktivitásának templátjaként funkcionálni.

A találmány egy második megvalósulása egy polipeptid/polinukleotid-hibrid molekuláris próba, mely immunvizsgálatokban a detektálható jel amplifikálójaként használható.

Ez a "multimer próba" két domént tartalmaz:

/a/ egy első domént /A/, mely olyan polipeptid, mely

egy az ismert antigénhez specifikusan kötődő antitestként képes funkcionálni;

/b/ egy második domént /M/, mely több egyszáлу oligonukleotid alegységet tartalmaz, melyek képesek a kérdéses egyszáлу nukleinsav szekvenciához specifikusan kötődni; és

/c/ az első és a második domén összekapcsolására szolgáló eljárást.

A találmány egy másik aspektusa egy immunvizsgálatban egy detektálható jel amplifikálásának egy módszere, melyben a supra leirt polimeráz próbát használjuk. Ez a módszer a következőkkel jellemezhető:

/a/ az antigenikus analitot direkt vagy indirekt módon egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk;

/b/ az első molekuláris próbát direkt vagy indirekt módon az analithoz kötjük. a próba a következőket tartalmazza:

/i/ egy kötő domént /A/;

/ii/ egy második domént /B/, mely egy kétszálu DNS szekvencia, mely egy DNS-függő RNS polimeráz enzim aktivitás promótereként képes funkcionálni; és

/iii/ egy harmadik domént /C/, mely vagy egyszáлу vagy kétszálu és a B doménnel szomszédos oly módon, hogy a harmadik domén a második domén promóter aktivitására szolgáló templátként képes funkcionálni.

/c/ a nem kötődött próbát eltávolítjuk;

/d/ az RNS oligomerből számos kópiát transzkriptálunk

a DNS-függő RNS polimeráz aktivitáson keresztül, melyek a próba szerkezet harmadik doménjének /C/ templát szekvenciájával /c'/ komplementerek; és

/e/ a transzkripteket mennyiségileg meghatározzuk.

A találmány egy másik aspektusa egy immunvizsgálatban a detektálható jel amplifikálásának egy másik módszere a supra leírt multimer próbák használatával. Ez a módszer a következőkből áll:

/a/ az analitot direkt vagy indirekt módon egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk;

/b/ az analithoz direkt vagy indirekt módon egy hibrid molekuláris próbát kötünk, mely a következőkből áll:

/i/ egy kötő doménből /A/, mely egy olyan polipeptid, mely a kérdéses antigénhez specifikusan kötődni képes antitestként képes funkcionálni; és

/ii/ egy második doménből /M/, mely több egyszá-
lu DNS oligonukleotid alegységet tartalmaz, melyek képesek specifikusan kötődni egy egyszá-
lu jelölt oligonukleotid-
hoz; és

/iii/ az első és a második domén kötésére szolgáló módszerből.

/c/ a nem kötődött próbát eltávolítjuk;

/d/ egyszá-
lu, jelölt oligonukleotidokat hibridizálunk,
melyek tartalmazznak egy olyan nukleotid szekvenciát, mely
alapjában véve komplementer a domén M próba - a második
domén - alegység szekvenciájával.

/e/ a nem kötődött jelölt oligonukleotidokat eltávolítjuk; és

/f/ a próbához kötődő jelölt oligonukleotid mennyiségét meghatározzuk.

A találmány egy megint más megvalósulása egy kompetitív immunvizsgálatban egy detektálható jel amplifikálására szolgáló módszer, mely a következőkkel jellemezhető:

/a/ létrehozunk egy hibrid molekulát, melyben az A domén egy hapténként funkcionálni képes polipeptid és ez a domén egy a polimeráz próba B/C doménjéhez vagy a multimer próba M doménjéhez kötődik;

/b/ a hibrid molekulát direkt vagy indirekt módon egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk egy kompetitív analit jelenlétében;

/c/ a nem kötődő próbát eltávolítjuk; és vagy

/d/ a DNS-függő RNS polimeráz aktivitáson keresztül RNS oligomerek számos kópiáját transzkriptáljuk és a transzkripteket mennyiségileg meghatározzuk - ez az az eset, amikor a polimeráz próbát konjugáljuk; vagy

/e/ egyszáлу jelölt oligonukleotidokat hibridizálunk az M domén alegységeihez, a nem kötött jelölést eltávolítjuk és meghatározzuk a kötött jelölés mennyiségét - ez az az eset, amikor a multimer próbát konjugáljuk.

A következőkben megadjuk a találmány rajzainak rövid leírását.

1A ábra: egy monomer polimeráz típusu amplifikáló próba sematikus bemutatása. A nagybetűk a doméneket jelölik, a kisbetűk a doménen belüli szálakat. A kiemelt betű az alsó szálat jelöli /a 3'-tól az 5' felé olvasva, balról jobbra/. Az A domén egy olyan antitest, mely egy cél epitópot ismer fel. A B domén egy RNS polimeráz promótere. A c' szekvencia az RNS polimeráz templátja. A próba egy szálként szintetizálódik. Az AAAAAAA a C régió végén a poli-A kötőt képviseli, mely az önrenaturációt teszi lehetővé. Az A és B domének közötti A/T régió tetszés szerint szükséges a teljes antitest aktivitás megtartásához.

1B ábra: a polimeráz típusu amplifikáló próba egy megvalósulásának DNS szekvenciája. A B promóter domén a következő közös szekvenciákból áll: a bakteriofág T7 promóterből /5'-TAATACGACTCACTATA-3'/ és még 15 további maradvékből a promóter szekvenciától 5' irányban.

1C ábra: egy multimer polimeráz típusu amplifikáló próba sematikus bemutatása, melyben az A domén egy antitestként funkcionál és a kétszálu B és C domének önrenaturálódnak.

1D ábra: a multimer amplifikáló próbák sematikus bemutatása, melyben az A domén antitestként funkcionál és az

M domén több oligomer alegységből áll. Bemutatunk elágazó és fésű-szerű multimereket is.

A 2A ábra: egy szendvics immunvizsgálat sematikus bemutatása, mely magába foglalja a polimeráz típusu amplifikáló próbát. Az analit proteint indirekt módon egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk úgy, hogy komplexet képezünk egy első antitesttel /pl. egy "rab" /nyul/-antitesttel/; és indirekt módon az amplifikáló próbához kapcsoljuk oly módon, hogy egy második antitesttel képezünk komplexet /pl. egy egér antitesttel/.

A 2.B ábra: egy szendvics hibridizációs/immunvizsgálat rendszer sematikus bemutatása. Az analit proteint a fentiek szerint indirekt módon immobilizáljuk. A második antitesttel /egér-anti analit/ és egy hibrid antitest/polinukleotid molekulával komplexet képezünk, melyben a protein rész egy anti-egér antitestként funkcionál és a polinukleotid rész komplementer az amplifikáló próba a' nukleotid régiójával /ebben az esetben egy multimer próba/.

A 3. ábra: RNS polimeráz transzkriptek marker molekulaként való alkalmazását mutatja be immunvizsgálatban. Miután a polimeráz próbát magába foglaló szendvics komplex létrejön RNS polimeráz₂ adunk hozzá és több RNS transzkript /c/ - melyek komplementerek a templát szekvenciával /c'/ - termelődik. Ezen szekvenciáknak két aldoménje van: a c₁-et -mely a befogó próbával komplementer - szilárd

szubsztráton immobilizáljuk; és a c_2 , mely a jelölő próbával komplementer. Ez lehetővé teszi a jelölő anyag közvetett immobilizálását és a hibridizációs vizsgálati jel egyszerű mennyiségi meghatározását. A "x" a beépített jelölő anyagot jelöli, mely lehet radioaktív, kemilumineszcens, fluoreszcens vagy enzimátikus.

A 4. ábra /A-F részek/ a "fésű-szerű" és/vagy szétágazó szerkezetű multimerok előállításában használt eljárásokat mutatja be.

A következőkben megadjuk a találmány részletes leírását.

A találmányban a következő fogalmakat használtuk.

A "detektálható jel" egy örökölhető jele egy biokémiai esemény előfordulásának, mint pl. a nukleinsav hibridizációnak vagy egy antigén és antitest kötődésének. A találmány leír az immunvizsgálatok detektálható jelének amplifikálására szolgáló módszereket.

A "DNS-függő RNS polimeráz" egy olyan enzim, mely egy komplementer DNS templátból származó specifikus szekvencia RNS-ének polimerizációját segíti elő.

A "domén" egy biokémiai molekula egy olyan adott régiója, melyet funkciója jellemez.

Az "epitóp" az immunogén molekula azon része, melyet specifikusan ismer fel a megfelelő antitest és mely a meg-

felelő antitesttel komplexet képez, egy immunológiai reakcióban.

A nukleotid/peptid "hibrid" molekula tartalmaz mind nukleinsav maradókat és aminosav maradókat, mindegyiket a molekula egy elkülönült funkcionális doménjében.

Az "immunogén" egy olyan anyag, mely specifikus módon képes egy antitesttel reagálni.

Az "immunológiai reakció" az antitest specifikus felismerése és kötődése egy immunogén epitópjához. Az "immunovizsgálat" egy olyan módszer, melyben meghatározzuk egy epitóp jelenlétét úgy, hogy egy immunológiai reakciót kombinálunk a reakció detektálására és mennyiségi meghatározására szolgáló módszerrel.

A "polidezoxiribonukleotid" egy polimer DNS molekula. A "polinukleotid" egy polimer DNS vagy RNS molekula.

A "promóter" egy polidezoxiribonukleotid egy olyan helye, melyhez egy RNS polimeráz enzim kötődik a transzkripció iniciálása előtt.

Az "RNS-függő RNS polimeráz" egy olyan enzim, mely egy komplementer RNS templátból származó specifikus szekvencia RNS-ének polimerizációját segíti elő.

A "transzkripció" egy olyan enzim által közvetített folyamat, mely révén RNS jön létre egy komplementer polinukleotid templátból.

A kettősszálu DNS molekula "felső szála" az a szál, melynek 5' vége a bal oldalon van, mivel a szekvencia bal-

ról jobbra olvasódik. Ezen szál szekvenciáját mindig bemutatjuk a komplementer "alsó száljának" szekvenciája fölötte. Az alsó szál 3'-től az 5' felé balról jobbra olvasódik.

A következőkben megadjuk a találmány kivitelezésének módjait.

I Amplifikációs próbák

A. Polimeráz próbák.

A találmány egy aspektusa egy DNS amplifikációs próba /polimeráz próbaként hivatkozunk rá/, mely három funkcionális domént tartalmaz. Ezt a próbát az immunvizsgálatokban a detektálható jel erősítésére használjuk.

Az első domén /A - 1A ábra/ egy olyan polipeptid, mely antitestként funkcionál a választott antigánnal szembeni specifitást mutatva. A polipeptid funkcionális régióját egy olyan régió követi, mely vagy aminosav vagy nukleinsav maradékokból áll, pl. egy spacer régió, mely alapján véve nem módosítja az antitest aktivitását. Az antitest aktivitás lehet magának az analitnak egy epitópjára specifikus; azonban egy előnyben részesített megvalósulásban az antitest a kérdéses infra leírt vizsgálatban használt /pl. anti-nyul IgG vagy anti-humán IgG, lásd a 2A áb-

rát/ immunoglobulin egy antigenikus determinánsára irányul.

Az alkalmazásban az analitot kapcsolatba hozzuk egy specifikus antitesttel, a felesleges antitestet eltávolítjuk és ezután az amplifikációs próbát reagáltatjuk a kötött antitesttel.

Előnyösen az analitot először egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk az egymást követő mosási eljárások elősegítése céljából. Ez az immobilizálás lehet direkt /pl. az analitot tartalmazó biológiai készítményt köthetjük egy nitrocellulóz szűrőhöz/ vagy indirekt /pl. egy specifikus antitestet immobilizálhatunk egy szilárd szubsztráton és az analitot ezután kötjük az immobilizált antitesthez/.

A második domén /B - 1A ábra/ általában 10-40 bázispár hosszúságú, előnyösen 20-35 bázispár hosszúságú, még előnyösebben 30-35 bázispár hosszúságú, kétszálú és DNS-irányított RNS polimeráz promóterként funkcionál. Ez a promóter általában egy bakteriális fág promóter szekvenciájából származik, előnyösen a T3-as, T7-es vagy az SP6-os fágok bármelyikéből, még előnyösebben a T7-es bakteriofágból. Az RNS polimerázok ezen osztálya erősen promóter specifikus. Talán a legjobban jellemzett promóter a T7-es /1B ábra/. Tizenhét /17/ T7 promóterből származó DNS szekvencia ismert és a közös szekvenciát megfejtették: 5'-TAA TACGACTCACTATA-3' /Oakley and Coleman, Proc. Natl. Acad. Sci. /1977/ 74:4266; Dunn and Studier, J.Molec.Biol. /1983/ 166:477/. A komplementer szálon a promótertől 3' irányban

levő szekvenciák /a c' szegment, melynek 3' vége a b' szegment 5' végével szomszédos/ transzkripciós templátként szolgálnak és számos templát szekvencia variáció transzkripciója illeszthető hozzá /1B ábra/. Csupán maga a promóter régió kell kétszálú legyen /Milligan et al., Nuc. Acids Res. /1987/ 15:8783/.

A promóter 5' végén elhelyezkedő részek kevésbé befolyásolják a transzkripciót. Például az előnyben részesített megvalósulásban a B régió a T7-es promóter közös szekvenciájából valamint a közös szekvenciától 5' irányban a PvuII restrikciós helyig tartó további bázisokból áll, melyek megegyeznek a pT7 plazmidok /beszerezhető a US Biochemicals-től/ szekvenciájával /1B ábra/. Ezek a szekvenciák lehetnek idegen szekvenciák is.

A harmadik domén /C - 1A ábra/ közvetlenül a második domén 3' végénél helyezkedik el és ezen domén c' szála a B promóter domén templátjaként szolgál. A C domén általában 30-80 nukleotid hosszúságú, előnyösen 35-50 nukleotid hosszúságú, még előnyösebben 40-45 nukleotid hosszúságú. Ez a domén lehet akár egy akár kétszálú. A c' templát szál 3' vége /közvetlenül szomszédos a promóterrel/ általában egy citozin maradék és következésképpen a felső szál 5' vége általában egy guanozin maradék.

A C domén RNS transzkripciós terméke /c/ az analit jelenlétének és mennyiségének marker molekulájaként funkcionál./3. ábra/. A jel amplifikáció azért megy végbe, mert

minden egyes templát $10^1 - 10^4$ transzkriptet hoz létre. Ezen domén szekvenciáját egy random szekvenciával terveztük, komputer analízissel értékeltük a rendszerben levő más próbákkal való keresztreakciók lehetőségének minimalizálása céljából.

A C domén szekvenciáját egy specifikus detektálási sémához terveztük meg, számos ilyen séma alkalmazható a transzkriptek mennyiségi meghatározásához. Például a C domén transzkripció termékét $/c/$ két aldoménre osztható - a c_1 és c_2 -re /3. ábra/. A c_1 aldomén egy szilárd szubsztráton immobilizált transzkript befogó próbával komplementer. A c_2 aldomén egy jelölő próbával komplementer. Hibridizáció után a visszatartott jelölő anyag mennyisége lineárisan arányos az eredeti mintában jelenlevő analit mennyiségével.

Egy alternatív megvalósulásban a C domén transzkriptjének csupán a c_1 aldoménje létezik. A C domén jelölt ribonukleotid trifoszfátáz jelenlétében iródik át és ezután a jelölt transzkriptet egy immobilizált transzkript befogó próbához kötjük komplementer c_1 aldoménjén keresztül és meghatározzuk mennyiségét.

Egy megint másik megvalósulásban a C doménnek csak a c_2 aldoménje létezik. A C domén biotinizált ribonukleotid trifoszfátáz jelenlétében iródik át és a transzkripteket avidin gyöngyökön fogjuk be. A transzkriptet ezután egy jelölő próbához anneáljuk komplementer c_2 aldoménjén ke-

resztül és meghatározzuk mennyiségét.

Az amplifikáló próba transzkriptjei jelölésének és detektálásának számos más módszere lehetséges, ideértve a jelölt ribonukleotidok és az avidin/biotin párosítás egyidejű alkalmazását és ezek egyértelműek a tudomány e területén képzett szakember számára.

A polimeráz próbák B és C doménjei előállíthatók klónozással, enzimátikus összeállítással, kémiai kereszt kötéses technikákkal, közvetlen kémiai szintézissel vagy ezek kombinációjával. Ha klónozással állítjuk elő ezeket, a teljes B/C domént vagy ezek fragmentjeit kódoló nukleinsav szekvenciák egy vagy kétszálu formában állíthatók elő hagyományos klónozási eljárásokkal.

A B domén kétszálu, a C domén lehet vagy egy vagy kétszálu. A kétszálu domének két módon állíthatók elő: a szálak külön klónoozhatók, majd ezt követően a komplementer szálak hibridizálhatók; vagy másik lehetőségként a próba klónoozható egyszálként, önrenaturálódó pulinukleotidként /pl. b', c', c, b/. Ebben az esetben 4-10 további nukleotidot, előnyösen 5-7 nukleotidot adunk a szekvenciához spacerként a c és c' közé a kétszálu régió megfelelő körvonalazása céljából, amikor az önrenaturált. A spacer általában poli-A, de lehet módosított a vizsgálat különböző próbái közötti hibridizációs keresztreakciók minimalizálása céljából.

Az A domén konjugálható a B/C doménhez közbehelyezett

kötő anyagok - ilyenek pl. a nukleinsav, az aminosav, a szénhidrát vagy a poliol hidak - vagy más keresztkötő anyagokon keresztül. A B/C domén szintetizálható egy 5' nukleinsav maradékkal, melyet úgy származtattunk, hogy legyen egy olyan funkciós csoportja, mely biztosítja az A domén számára egy kötő helyet, vagy a maradék az oligonukleotid szintetizálása után származtatható egy ilyen hely biztosítása céljából. A kémiai keresztkötéshez egy előnyben részesített eljárás során egy N⁴-módosított citozin bázist a polinukleotid 5' végéhez építünk be a o2258o7 közzétételi számú EP Alkalmazásban leírtak szerint.

Egy még előnyösebb megvalósulásban a B/C domén DNS A domén antitesthez való konjugálását az enzim konjugálással analóg módon lehet elvégezni. A B/C domént úgy szintetizáljuk, hogy tartalmazzon egy alkilamin részt. Az alkilamint egy olyan heterobifunkcionális keresztkötő ágenssel reagáltatjuk, mint a szukcinimidil 4-/maleimidometil/ciklohexán-1-karboxilát /SMCC/. Az oszlop tisztítása után a DNS specifikusan reagáltatható a szulfihidril csoportokkal. Egy antitest tartalmazhat egy reaktív szulfihidrilt /mint pl. a redukált F/ab'/₂-ben vagy lehet módosított, hogy tartalmazzon egy szulfihidrilt /mint pl. amikor N-szukcinimidil 3-/2-piridilditio/propionáttal /SPDP/ módosítjuk, majd redukáljuk/. Homobifunkcionális reagensekkel lehetséges a közvetlen DNS-amin -antitest-amin konjugáció is, de ezt általában sokkal nehezebb ellenőrizni.

B Multimer próbák

A találmány egy másik megvalósulása egy DNS amplifikációs próba /"multimer próbaként" hivatkozunk rá/, mely két funkcionális domént tartalmaz, az első domén az A domén, mely ugyanaz, mint a supra leirt polimeráz próba A doménje és a második /M - 1D ábra/, mely számos ismétlődő alegységből áll. Ez a próba, akárcsak a supra leirt polimeráz próba, szintén a jel amplifikációra használatos immunvizsgálatokban.

Az M domén polinukleotidja lehet ugyanazon ismétlődő egyszáлу oligonukleotid alegység vagy különböző egyszáлу oligonukleotid alegységek lineáris vagy elágazó polimere. Ezek az alegységek képesek specifikusan és stabilan hibridizálódni a kérdéses egyszáлу nukleotidhoz, tipikusan egy jelölt nukleotidhoz vagy egy másik multimerhez. Ezek az egységek normál esetben 15-50, előnyösen 15-30 nukleotid hosszúságúak és GC tartalmuk 40-60 % közé esik. A multimerben az oligonukleotid egységek teljes száma általában 3-50 közé esik, még gyakrabban 10-20 közé. A multimernek oligonukleotid egységei állhatnak RNS-ből, DNS-ből, módosított nukleotidokból, vagy ezek kombinációból.

A multimer oligonukleotid alegységei kovalensen kapcsolódhatnak közvetlenül egymáshoz foszfodiészter kötésekkel vagy közbehelyezett kötő ágenseken keresztül, mint pl. nukleinsav, aminosav, szénhidrát vagy poliol hidakon ke-

resztül, vagy más keresztköti ágenseken keresztül, melyek képesek a nukleinsavat vagy a módosított nukleinsavat keresztkötni. A kötési hely/ek/ lehetnek az alegység végein /vagy normál 3'-5' orientációban, vagy véletlenszerű orientációban/ és/vagy a szálon belül egy vagy több közbenső nukleotidnál.

Lineáris multimerekben az egyes alegységek vég-vég kapcsolódásuak így lineáris polimert hoznak létre. Az elágazó multimerek egyik típusában három vagy több oligonukleotid egység ered egy kiindulási pontból elágazó szerkezetet hozva létre. Az eredési pont lehet egy másik oligonukleotid alegység vagy egy multifunkcionális molekula, melyhez legalább három egység köthet kovalensen. Egy másik típusban van egy oligonukleotid alegység gerinc, melyhez egy vagy több függő oligonukleotid alegység kapcsolódik. Ezek az utóbbi típusu multimerek a következő szerkezetük: "villa-szerű", "fésű-szerű", vagy ezek kombinációi. A függő egységek normális esetben egy módosított nukleotidról függnnek, vagy más szerves részről, mely megfelelő funkcionális csoportokkal rendelkezik, melyekhez az oligonukleotidok konjugálhatnak vagy másként kapcsolódhatnak. Lásd az 1D ábrát.

A multimer lehet teljesen lineáris, teljesen elágazó vagy lehet a lineáris és elágazó részek kombinációja. Előnyösen legalább két elágazási pont található a multimerben, még előnyösebben legalább 15, még előnyösebben 15-50.

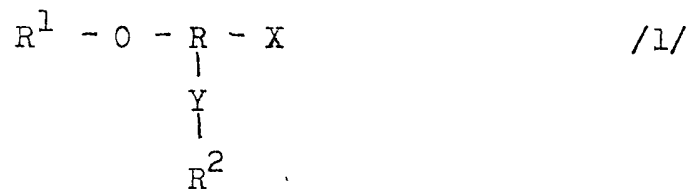
A multimer tartalmazhatja kétszálu szekvenciák egy vagy több szegmentjét.

Az M domén előállítható klónozással /ha lineáris/ enzimikus összeépítéssel, kémiai keresztkötéses technikákkal, közvetlen kémiai szintézissel vagy ezen módszerek egy kombinációjával. A szintézis ezen módszerei részletes leírásra kerültek az 1989 máj. 5-én közzétett 89/03891 publikációs számú nemzetközi szabadalmi alkalmazásban. A klónozással előállított lineáris multimeres esetében a teljes multimer vagy annak fragmentjeit kódoló nukleinsav szekvencia egyszálu vagy kétszálu formában állítható elő hagyományos klónozási eljárásokkal. Ha kétszálu formában állítjuk elő a multimerket/fragmenteket végül denaturáljuk, hogy egyszálu multimerket/fragmenteket kapjunk. A multimeres egyszálu formában is klónozhatók olyan hagyományos egyszálu fágvektorokat használva, mint az M13. A fragmentek összeépíthetők enzimikusan vagy kémiailag az M domén multimer létrehozása céljából. Ha enzimikusan állítjuk össze az egyes egységek olyan ligázzal ligálhatók, mint pl. a T4 DNS vagy RNS ligáz, az esettől függően. Ha kémiai keresztkötéssel állítjuk elő az egyes egységeket egy vagy több nukleinsavval szintetizáljuk, melyeket úgy származtattunk, hogy olyan funkciós csoportjaik legyenek, melyek biztosítják a kötő helyeket vagy azután származtatjuk, hogy az oligonukleotidot úgy szintetizáltuk, hogy ilyen helyeket biztosít. A kémiai keresztkötés egy előnyben részesített eljárásá-

ban N⁴-módosított citozin bázisokat építünk a nukleotidba a 225,807-es számú EP alkalmazásban leírtak szerint, melynek leírását a hivatkozás révén a találmányba építettük.

Ha közvetlen kémiai szintézissel állítjuk elő a származtatott nukleinsavakat vagy ekvivalens sokfunkciós molekulákat - melyeknek funkcionális csoportjai blokkoltak - tartalmazó oligonukleotidokat hagyományos oligonukleotid szintézises technikákat alkalmazunk. A blokkolt funkciós csoportokat felszabadítjuk és az oligonukleotid egységeket a felszabadított hely/ek/ről szintetizáljuk.

A multimerekben az elágazási pontok előállítására használt molekulák általános szerkezete a következő:

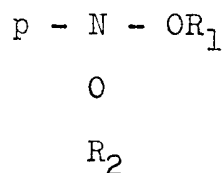


ahol, R egy szerves rész, előnyösen egy nukleinsav, R¹ egy hidroxil védő csoport, mely eltávolítható olyan körülmények között, melyek nem távolítják el a szintetikus nukleinsavat a szilárd fázisból és melyek az exociklikus nitrogén vagy foszfát csoportokat nem távolítják el. Az X egy foszfort tartalmazó csoport, mely elősegíti a nukleinsav szintézist ilyen pl. a védett foszforamidit, a foszfonát vagy foszfát csoport; Y egy nukleofil csoportból - mint pl. egy amino, hidroxil, szulfihidril vagy védett foszfát - származó gyök, az R² vagy azonos R¹-gyel vagy egy olyan blokkoló

vagy védő csoport, mely eltávolítható és hidrogénnel helyettesíthető anélkül, hogy az R^1 -et befolyásolná. A szétágazó vagy villa-szerű elágazások létrehozásához használt molekulákban R^1 és R^2 ugyanaz; azonban a "fésű-szerű" elágazások létrehozására használt molekulákban az R^2 egy olyan blokkoló csoport, mely az R^1 deblokkoló reagens jelenlétében stabil. A 4. ábra sematikusan mutatja be a "fésű-szerű" "villa-szerű" vagy ezek kombinációját mutató elágazásokat tartalmazó multimerok szintetizálására használt eljárásokat.

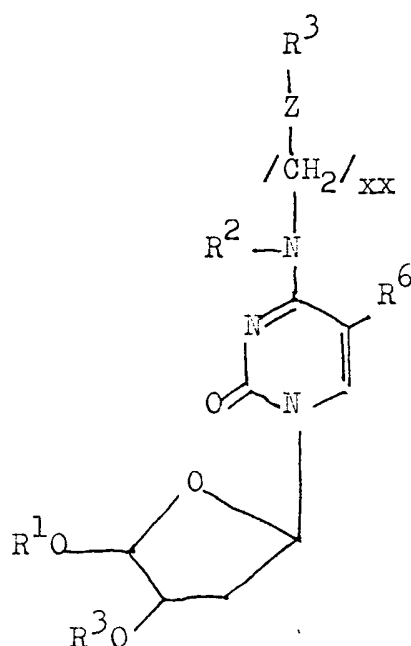
A 4. ábra A része egy hagyományos oligonukleotid szintézises vázlatot mutat be, melynek során lineáris oligonukleotidot állítunk elő. Ilyen módszer pl. az automatizált foszforamidit módszer /Warner et al., DNA /1984/ 3:401/. A sötét rész egy szilárd támasztékot képvisel, az N egy nukleotidot, a p-N-OR₁ /R₁ a lenti R^1 -gyel azonos/, egy hagyományos nukleotid származékot, melynek megfelelő védő csoportjai vannak.

Az ábra B része a "fésű-szerű" multimer előállításának eljárását mutatja. A vegyület:



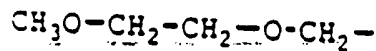
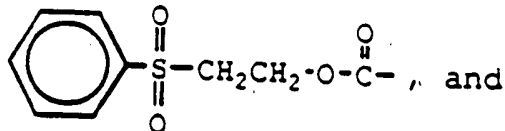
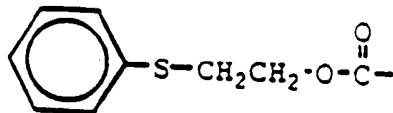
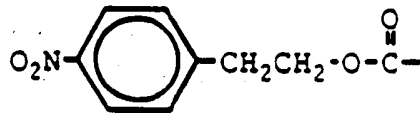
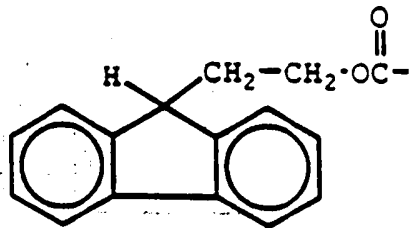
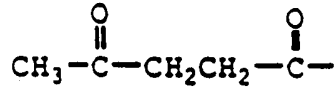
a lenti /2/ szerkezeti képlet módosított bázisát képviseli. Egy kivánt méretű és szekvenciájú oligomer egységet szintetizálunk és a támasztékon hagyjuk. Ezután egy vagy több

N⁴-módosított citozin bázist építünk be a láncba az említett automata eljárással. Előnyösen a módosított bázis szerkezeti képlete a következő:



/2/

ahol Z egy olyan nukleofil, mint pl. -O-, -NH-, -S-, PO₄=⁰ és -OC-O-, R¹ egy blokkoló vagy egy végő csoport, mint pl. a dimetoxitritil /DMT/ vagy pixil, mely általában bázis stabil és sav érzékeny, az R² hidrogén vagy metil, az R³ egy blokkoló vagy védő csoport, mely eltávolítható és hidrogénnek helyettesíthető anélkül, hogy az R¹-et befolyásolná - mint pl. a

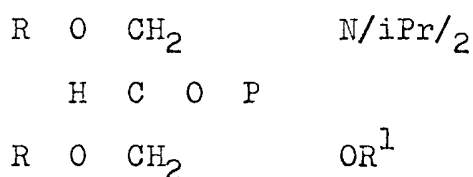


az R⁵ egy foszforamidit vagy más foszfor származék, mely lehetővé teszi egy oligonukleotid lánc 5' pozíciójához való nukleotidok hozzáadását a kémiai szintézis során /pl. egy foszfodiészter, foszfortriészter stb/, az R⁶ metil, hidrogén, I, Br, vagy F és az X egy 1-8 terjedelmű egész szám az 1-et és a 8-at is beleértve. Ha egynél több módosított bázist építünk be ezeket előnyösen köztes bázisokkal

helyezzük el a láncban, még előnyösebben egy -TT- dimerrel. További oligonukleotid egységek építhetők be a gerincbe, melyet további módosított bázisok követhetnek és így tovább.

Ezután a N⁴ nukleofil csoportot kivonjuk a védelem alól /az R³-at eltávolítjuk/ és további oligonukleotid egységeket hozunk létre belőle automata eljárással. A maradék R¹ csoportokat a láncvégekről eltávolítjuk és az elágazó "fésű-szerű" multimeret lehasítjuk a támasztékról.

A 4. ábra C része a "villa-szerű" multimernek általános előállítási módszerét írja le. Ebben az esetben is egy kívánatos méretű és szekvenciájú oligomer egységet szintetizálunk hagyományos technikákkal és a támasztékon hagyjuk. Ezután egy blokkolt kétfunkciós foszfortartalmu csoportot /XP-vel jelöltük a C részben/ - ilyen pl. a blokkolt foszforamidit - építünk be a láncba az automata eljárással. Az előnyben részesített kétfunkciós foszfortartalmu csoportok a következő szerkezetű blokkolt foszforamiditek:



ahol R az említett hidroxil védő csoport, iPr izoprópil és R¹ metil vagy béta-cianoetil. Legelőnyösebben az R DMT és R¹ béta-cianoetil.

Másik lehetőségként az N⁴-módosított citozin bázis, ahol ahol R₁ = R₂ /pl. DMT/ használható.

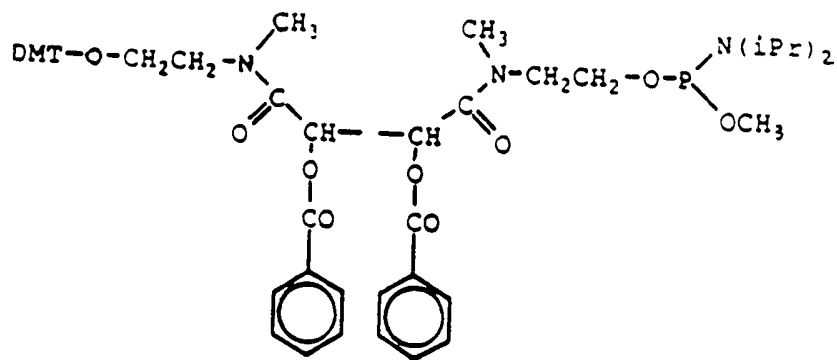
A két védő csoportot ezután eltávolítjuk és további oligonukleotid egységeket hozunk létre belőlük az automata eljárással. A maradék R^1 csoportokat eltávolítjuk és a szétágazó multimert lehasítjuk a támasztékról.

A D és E részek olyan eljárásokat írnak le, ahol két vagy több szétágazó multimert, "fésű-szerű" multimereket vagy ezek kombinációit építjük össze enzimatikusan vagy kémiai eljárással. Általában a szétágazó és/vagy "fésű-szerű" multimereket a fentiek szerint állítjuk elő és távolítjuk el a támasztékról. Ezután egyesítjük őket oldat formájában a fent leírt enzimátikus vagy kémiai kötési eljárásokat használva.

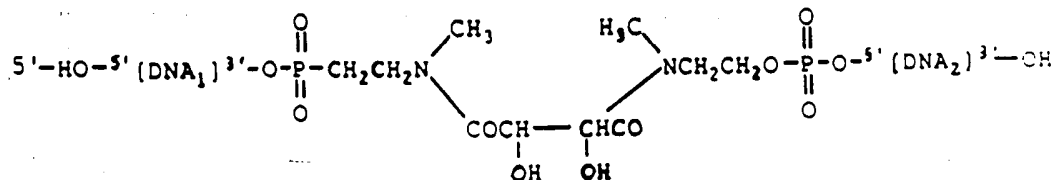
Az F rész egy többszörös "fésű-szerű" multimer szintetizálási eljárását mutatja. Ez az eljárás a B részben bemutatott eljárás egy változata és magába foglalja a módosított bázisok függő oldalláncokba való beépítését és ezekből a másodlagos oligonukleotid oldalláncok létrehozását.

Megfelelő hasítható linker molekulák építhetők be a multimerbe előre meghatározott helyeken a multimer szerkezetének vizsgálata céljából vagy előre meghatározott szegmentek felszabadításának eszközeként /ilyen pl. a multimer azon része, mely a jelölt oligonukleotidhoz kapcsolódik/. A multimer szintézisét és tisztítását követően ezek a linkerek specifikusan hasíthatók a multimer nukleotid szerkezetének további roncsolása nélkül. Egy előnyben részesített linker molekulát úgy terveztünk meg, hogy tartal-

mazon 1,2-diol csoportot /mely szelektíven hasítható per-
jodátokkal/ valamint egy védett hidroxil és foszforamidit
eredeti hidroxil csoportot, lehetővé téve azt, hogy a lin-
ker bármely DNS fragmentbe beültethető legyen standard
foszforamidit kémiai eljárásokat használva. Egy ilyen lin-
ker előnyben részesített megvalósulása a következő vegyü-
let:

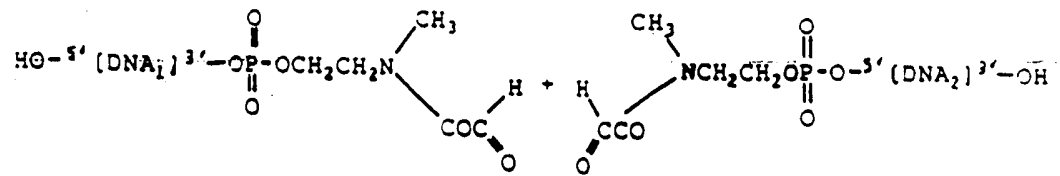


ahol a DMT és az iPr a korábban meghatározott. A DNS frag-
mentbe való beépülés és a teljes deprotektálás után a lin-
kert tartalmazó fragment szerkezete a következő:



ahol a DNS₁ és a DNS₂ olyan DNS alegységeket képviselnek,

melyek lehetnek azonosak vagy különbözők. Ezen fragment nátrium-perjodáttal való reakciója a fragmentet a következő alfragmentekre hasítja:



Másik megoldásként az 1,2-diol csoport helyettesíthető olyan linker csoportokkal, melyek tartalmaznak egy hidroxilamin-érzékeny kötést, egy bázis-érzékeny szulfon kötést vagy egy tiol-érzékeny diszulfid kötést. Az ilyen linker csoportok származhatnak hagyományos keresztkötő anyagokból, melyeket fehérjék más anyagokhoz való konjugálására használunk. Hasonlóan DMT-től eltérő védőcsoportok is használhatók.

A polimeráz próba funkcionális aspektusai kombinálhatók a multimer próba szerkezettel azáltal, hogy egy a polimeráz próba több promóter/templát /B/C/ doménből álló alegységekkel rendelkező M domént tartalmazó multimer próbát szintetizálunk. A multimer próbákhoz hasonlóan a multimer alegységek lehetnek vagy lineáris elrendezésű vagy elágazó molekulák.

A polimeráz próbákhoz hasonlóan a multimer próbák A doménje az M doménhez konjugálható közbehelyezett kötőanyagok segítségével. Ilyenek pl. a nukleinsav, az amino-

sav, a szénhidrát vagy a poliol hidak vagy más keresztkötő anyagok. Az M domén szintetizálható egy 5'-nukleinsav maradékkal, melyet úgy származtattunk, hogy legyen egy az A domén számára kötőhelyet biztosító funkciós csoportja, vagy a maradék származtatható az oligonukleotid szintetizálása után egy ilyen hely biztosítása céljából. A kémiai keresztkötés egy előnyben részesített eljárása a következő: egy N⁴-módosított citozin bázist a polinukleotid 5' végénél beépítünk a o2258o7 közzétételi számú EP alkalmazásban leírtak és a supra I/A/ részben leírtak szerint.

II. Immunvizsgálatok

A találmány egy másik aspektusa amplifikáló próbákat alkalmaz immunvizsgálatokban az immunológiai analit jelenlétének és koncentrációjának detektálása és mennyiségi meghatározása céljából. Ezek az amplifikáló próbák két osztályba tartoznak: az I részben leírt /supra/ hibrid próbák /vagy polimeráz próbák vagy multimer próbák/; vagy a 463, o22 sorozatszámú US szabadalomban és a 34o,031 sorozatszámú US szabadalomban leírt polinukleotid próbák azzal az eltéréssel, hogy az A domének polipeptid helyett polinukleotid szekvenciából állnak.

Az analit lehet bármely ismert kérdéses immunogén. Az analit jelen lehet egy elkészített mintában alacsony koncentrációban vagy kisebb mennyiségű alkotója lehet bi-

ológiai anyag heterogén keverékének. Az analit számos forrásban lehet jelen, pl. biológiai folyadékokban vagy szövetekben, élelmiszerekben, környezeti anyagokban, stb de szintetizálható in vitro is.

Az első lépésben az analitot tartalmazó mintát előkészítjük a tudomány e területén képzett szakember számára ismert számos módszer bármelyikével.

Az amplifikáló próbák az analit bármilyen számu immunvizsgálati eljárásban való detektálására használhatók - akár oldott, akár szilárd fázishoz kötött formában. Ha az immunvizsgálatot oldatban végezzük az analitot tartalmazó mintát vagy közvetlenül kötjük az amplifikáló próbához, közvetetten az analitra specifikus egy vagy több antitestten keresztül, vagy ha polinukleotid próbát alkalmazunk egy hibrid kötő molekulával együtt /a II. rész /B/ részében vitatjuk meg infra/. Ezen a módon az amplifikáló próbák a legtöbb oldatban végzett immunvizsgálati eljárásban alkalmazhatók. Lásd pl. a 4,778,751 számú US szabadalmat.

Egy szilárd fázist felhasználó immunvizsgálatban az analitot /mely lehet akár egy antigén vagy egy antitest/ vagy közvetlenül a szilárd fázison immobilizáljuk; közvetve az analitot egy első antitesthez kötve, mely antitestet először egy szilárd fázishoz kötöttük; vagy egy szendvics vizsgálattal /2A ábra/, melyben a második antitest felismeri az analitot és így felismeri a szilárd fázishoz kötött

első antitestet.

Ha az analitot közvetlenül szándékozunk a szilárd fázishoz kötni, az analitot tartalmazó mintát egy nitrocellulóz szűrővel hozzuk érintkezésbe vagy hasonló módon egy nem szelektíven kötött fehérjével. Ha az analitot indirekt módon és szelektíven kötjük egy szilárd fázishoz, egy első antitestet - mely az analit egy epitópjára vagy egy második antitestre irányul - konjugáljuk a szilárd fázishoz és ezután használjuk fel az analit kötésére vagy az analithoz kapcsolódott második antitest megkötésére.

A Hibrid próbák használata

Egy további antitest, mely az analit második epitópjára irányul, alkalmazható az analit és az amplifikáló próba közötti kötőként. Az amplifikáló próba - akár egy polimeráz próba, akár egy multimer próba - melyek A doménje a második antitestre irányul - ezután a kötő antitesthez konjugálható egy a szilárd fázishoz kötött első antitestet egy második antitestet az analitot, egy kötő antitestet és az amplifikáló próbát tartalmazó szálat hozva így létre / 2A ábra/.

B Polinukleotid próbák használata

Egy alternatív megvalósulásban az alkalmazott ampli-

fikáló próba a 89/03891 nemzetközi közzétételi számú szabadalomban leírt polinukleotid multimer próbák egyike. Ezek a próbák abban különböznek a peptid/nukleotid hibrid multimer próbáktól, hogy az A domén egy antitestként funkcionáló polipeptid helyett egy polinukleotid szekvencia. Következésképpen egy antitest/polinukleotid hibrid kötőt kell alkalmazni az analit amplifikáló próbához való indirekt párosításához /2B ábra/. Ez a hibrid kötő rendelkezik egy első doménnel, mely egy olyan polipeptid, mely az analit epitópjára specifikus antitestként funkcionál, vagy egy az analitot felismerő antitest egy epitópjaként; valamint egy második doménnel, mely egy olyan nukleotid szekvencia, mely alapján véve komplementer az amplifikáló próba A doménjének nukleotid szekvenciájával.

Hasonlóan, egy alternatív megvalósulásban a 463,022 számú US szabadalomban leírt polinukleotid polimeráz próbák alkalmazhatók. Ezek a próbák a hibrid polimeráz próbáktól abban különböznek, hogy az A domén egy antitestként funkcionáló polipeptid helyett egy polinukleotid szekvencia. Ehhez a próbához szintén szükség van a hibrid kötők használatára, ahogy azt supra leírtuk.

Egy polinukleotid amplifikáló próbát és egy hibrid kötőt használva az I részben supra leírt hibrid amplifikáló próbák helyett, az amplifikáló próba lehet egy "univerzális" reagens, mely használható mind nukleinsav hibridizációs vizsgálatokban, mind immunvizsgálatokban.

C A kötés és a hibridizáció körülményei

Egy előnyben részesített megvalósulásban az analitot közvetett módon egy szilárd fázison, pl. egy 96 üregű polivinilklorid /PVC/ lemezen immobilizáljuk. A 2A ábrán leírt szendvics vizsgálatban az első antitest /anti-nyul 20 µg/ml koncentráció 0,2 M-os NaHCO₃-ban/ 50 µl mennyiségét adjuk az üregekhez. Az üregeket lefedjük és 2 óráig szobahőmérsékleten inkubáljuk nedvesített atmoszférában. Az oldatot ezután elpárologtatjuk az üregekből. Ezután az üregeket kétszer 0,02 %-os nátrium-azidot tartalmazó foszfát pufferolt sóoldatban levő 3 %-os szarvasmarha szérum albumint tartalmazó blokkoló pufferrel mossuk. Az üregeket ezután 20 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk nedvesített atmoszférában a blokkoló pufferrel, majd kétszer blokkoló pufferrel mossuk.

A második antitest /nyul-anti analit, szintén 20 µg/ml koncentrációban/ 50 µl mennyiségét adjuk az üregekhez és a fent leírt eljárást megismételjük. Ezután elkészítjük az analit hígítási sorozatát a blokkoló pufferben. Az egyes hígítások 50 µl mennyiségeit adjuk egy üreghez. A lemezt lefedjük és 2 óráig szobahőmérsékleten inkubáljuk nedvesített légtérben. Ezen inkubálás után az üregeket négyszer mossuk a blokkoló pufferrel. A harmadik antitestet /egér-anti-analit/ ezt követően ugyanezen a módon adjuk az üregekhez, melyet a hibrid amplifikáló próba hozzáadása kö-

vet. Mivel egyes szövet készítmények tartalmazhatnak anti-DNS-antitesteket a próba hozzáadása után a mosáshoz használt blokkoló puffer tartalmaz 20 $\mu\text{g/ml}$ lazac sperma DNS-at is.

Ha polinukleotid amplifikáló próbákat vagy hibrid multimer próbákat alkalmazunk egy nukleinsav hibridizációs lépés követi az analit és az antitestek komplexének képzését. Általában a hibridizációs körülmények vizes közeget tartalmaznak, előnyösen különböző adalékokat tartalmazó puffert tartalmazó vizes közeget. Ezek közé az adalékok közé tartoznak a hibridizálódó polinukleotidok, sók /pl. nátrium-citrát 0,017 M - 0,17 M és/vagy nátrium-klorid 0,17 M-1,7 M/, nem ionos detergenssek, mint pl az NP-40 vagy a Triton X-100 /0,1 - 1,0 %/, melyek nem befolyásolják az antigén/antitest komplexet és hordozó nukleinsavak. A keveréket 15-75 percig inkubáljuk 35-55 °C hőmérsékleten.

Ha a jelölt oligonukleotid multimer alegységekhez való hibridizációhoz alkalmazott körülmények az antigén/antitest komplexben instabilitást okoznak, a hibridizációs lépés megelőzhető a komplex fehérje keresztkötőkkel /pl. glutáraldehidde/ való kezelésével vagy egy a komplexet stabilizáló hasonló módszerrel. Ha a protein komplex stabilizálódott a nukleinsav hibridizáció körülményei megváltoztathatók, hogy tartalmazzon SDS-t /1 %-ig/, nem-vizes szolvenst /pl. dimetil formamidot, dimetilszulfoxidot és formamidot/ és a hőmérséklet 70 °C hőmérsékletig növelhe-

tő.

Lényeges, hogy a nukleinsav hibridizáció körülményeit úgy állítsuk be, hogy fenntartsuk az antigén/antitest komplexek stabilitását. Például a komplementer szekvenciák rövidebb szakaszainak hibridizációja alacsonyabb hőmérsékleten is elvégezhető. Egy előnyben részesített megvalósulásban a komplementer egyszáлу régiók 12-20 bázisuak. Egy előnyben részesített megvalósulásban a hibridizációs hőmérséklet 35-45 °C. Továbbá, mivel ebben a lépésben az egyszáлу oligonukleotidok közül csupán a komplementer szála vannak jelen, szigorubb körülmények és következésképpen alacsonyabb só koncentrációk /0,3 M Na/ tolerálhatók.

1. Multimer próba

Ha egy multimer próbát alkalmazunk, az M domén ismétlődő polinukleotidjával alapjában véve komplementer jelölt oligonukleotidot egymás után adjuk hozzá, olyan körülmények között, melyek lehetővé teszik a multimer komplementer oligonukleotidjaihoz való hibridizálódást. A nyert szilárd fázisu jelölt nukleinsav kopleket ezután mosással elkülönítjük a felesleges jelölt oligonukleotidtól, a nem kötött jelölt oligonukleotidok eltávolítása céljából és értékeljük.

Az amplifikáció megsokszorozható egynél több típusu multimer /ahogy az alegység szekvencia meghatározza/ vizs-

gálatban való alkalmazásával. Ilyen esetekben egy második multimer tervezünk az első multimer ismétlődő szekvenciájához való kötéshez és a komplexet ezt követően egy olyan oligonukleotiddal jelöljük, mely alapjában véve komplementer a második multimer ismétlődő szekvenciájával. Bármekkora számú multimer köthető sorozatban ily módon, a még nagyobb amplifikáció elérése céljából.

2. Polimeráz próba.

Ha egy polimeráz próbát alkalmazunk, az amplifikáló próba promóter régiójára /B domén/ specifikus RNS polimerázt adunk megfelelő transzkripció körülmények között és a C domén templátjának /c'/ több RNS kópiáját /c/ állítjuk elő. A transzkriptek mennyisége arányos a kezdeti készítményben jelen levő analit mennyiségével.

A transzkripció körülmények a következőket jelentik: vizes tápközeg, előnyösen pufferolt vizes tápközeg, megfelelő sókkal, általában egy magnézium só-t tartalmaz; rATP, rUTP, rGTP, rCTP egy RNS polimeráz enzim és általában különböző denaturáló anyagok, fehérje hordozók és RN-áz inhibitorok. Az inkubáció általában 15-90 percig tart, általában 60 percig és olyan hőmérsékleten, mely a választott enzimhez optimális, általában 35-42 °C, általában 37 °C.

A C domén szekvenciáját egy specifikus detektálási

sémához terveztük és számos ilyen séma alkalmazható a transzkriptek mennyiségi meghatározására. Például a C domén transzkripció termékét /c/ két aldoménre osztható - a c_1 és c_2 -re /2B ábra/. A c_1 aldomén a transzkript befogó próbával komplementer, melyet egy szilárd szubsztráton immobilizáltunk. A c_2 aldomén a jelölő próbával komplementer. Hibridizáció után a visszatartott jelölő anyag mennyisége egyenesen arányos az eredeti mintában jelen levő analit mennyiségével.

Egy alternatív megvalósulásban a C domén transzkriptjének csupán egy c_1 aldoménje van. A C domén a jelölt ribonukleotid trifoszfátáz jelenlétében íródik át és a jelölt transzkript ezután kötődik egy immobilizált transzkript befogó próbához annak komplementer c_1 aldoménjén keresztül és ezután határozzuk meg mennyiségét.

Egy megint más megvalósulásban a C domén transzkriptje csupán egy c_2 aldoménnel rendelkezik. A C domén a biotinizált ribonukleotid trifoszfátáz jelenlétében íródik át és a transzkripteket avidin gyöngyön fogjuk be. A transzkriptet ezután egy jelölő próbához anneáljuk annak komplementer c_2 aldoménjén keresztül, majd meghatározzuk mennyiségét.

Az amplifikáló próba transzkriptjének jelölésére és detektálására számos más módszer létezik; ezek közé tartozik a jelölt ribonukleotidok és az avidin /biotin párosítás szimultán alkalmazása. Ez a módszer a tudomány e területén jártas szakember számára jól ismert.

3. Általános szempontok

A vizsgálatban alkalmazott szilárd fázis lehet részecske, vagy lehet bármilyen típusu tartóedény szilárd felülete, pl. centrifugacső, oszlopok, mikrotiter lemezek üregei, szűrők, csövek, stb. Előnyösen részecskéket alkalmazunk, melyek mérete 0,4-200 mikron tartományba esik, még gyakrabban 0,8 - 4,0 mikron közé. A részecskék bármilyen megfelelő anyagból lehetnek, pl. latexből, vagy üvegből. Az analitra specifikus első antitest vagy az analitra specifikus második antitest stabilan kapcsolható a szilárd felszínhez a funkciós csoportokon keresztül, ismert eljárásokkal.

A jelölő próbák - ha polimeráz próbákat alkalmazunk - az amplifikáló próba transzkriptjeinek c_2 aldoménjeivel komplementer szekvenciákat foglalnak magukba; és ha multimer próbákat alkalmazunk a jelölő próbák a B domén ismétlődő egységeivel komplementer szekvenciákat foglalnak magukba. A jelölő próba egy vagy több molekulát /"jelölők"/ foglal magába, mely közvetlenül vagy közvetve szolgál detektálható jelként. A jelölők kötődhetnek a komplementer szekvenciák egyes tagjaihoz, vagy terminális tagként vagy több jelölővel rendelkező terminális farokként lehetnek jelen. A szekvenciákhoz kötődő jelölőket biztosító számos eljárás ismeretes az irodalomban. Lásd pl. Urdea et al., Nucl. Acids Res. /1988/ 16:4937, Leary et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA /1983/ 80:4045; Renz and Kurz, Nucl. Acids Res. /1984/ 12:3435; Richardson and Gumpert, Nucl. Acids Res. /1983/ 11:6167; Smith et al., Nucl. Acids Res. /1985/ 13:2399; Meinkoth and Wahl, Anal. Biochem. /1984/ 138:267 .

A jelölő anyagok vagy kovalensen vagy nem kovalensen kapcsolódhatnak a komplementer szekvenciához. Az alkalmazható jelölő anyagok közé tartoznak a radionukleotidok, a fluoreszcens anyagok, a kemilumineszcens anyagok, a festékek, enzimek, enzim szubsztrátok, enzim kofaktorok, enzim inhibitorok, enzim alegységek, fém ionok és hasonlóak. Az illusztratív jelölők közé a következők tartoznak: fluorescein, rhodamin, Texas-vörös, fikoeritrin, umbelliferin, luminol, NADPH, galaktozidáz, tormaperoxidáz stb. Lásd Urdea et al.,-t a nem radioizotópos jelölési módszerek összehasonlítása céljából. A jelölő próbák kényelmesen előállíthatók kémiai szintézissel, mint pl. amit a 225807 számú EP alkalmazás leír. Egy megfelelő funkciós csoportu terminális csoport biztosításával különböző jelölő anyagok kapcsolhatók össze a funkciós csoportokon keresztül. Így karboxi, tiol, amin, hidrazin vagy más funkciós csoportok biztosíthatók, melyekhez a különböző jelölők úgy kapcsolhatók, hogy lényegében nem befolyásolják a szekvenciával való duplex képződését. Ahogy már jelöltük rendelkezhetünk olyan molekulával is, melynek számos a jelölő szekvenciával komplementer szekvenciához kapcsolódó jelölője van. Alternatív lehetőségként rendelkezhetünk olyan ligandummal is

mely a jelölő szekvenciához kötődik és használhatunk egy jelölt receptort a ligandumhoz való kötéshez a jelölt analit komplex biztosítása céljából.

A jelölő anyag természetétől függően számos technika alkalmazható a jelölő anyag jelenlétének detektálására. A fluoreszkáló anyagokhoz nagy számu különböző fuorométer szerezhető be. Enzimekkel vagy fluoreszcens vagy szines termék biztosítható és ez vagy fluorometriásan vagy spektrofotometriásan vagy vizuálisan határozható meg. Az immunvizsgálatokban alkalmazott különböző jelölő anyagok és az immunvizsgálatokhoz alkalmazható technikák használhatók a jelen vizsgálatokban is.

A vizsgálatbszeparációs lépésében alkalmazott eljárás a szilárd fázis természetétől fűhh. Részecskék esetében centrifugálás vagy szűrés szolgál a részecskék szeparálásához, a felüluszó eltávolításához vagy a felüluszó izolálásához. Ahol a részecskéket vizsgáljuk a részecskéket alaposan mossuk, általában 1-5 alkalommal, megfelelő puffer tápközeggel, mely tartalmaz detergenst pl. PBS-t SDS-sel. Ha a szeparációs eszköz egy fal vagy egy támaszték, a felüluszó izolálható vagy eltávolítható és a fal mosható a részecskéknél leirtakkal azonos módon.

D. Kompetitiv immunvizsgálatok.

A találmány hibrid amplifikáló próbái szintén alkal-

mazhatók antigének jelölésére egy kompetitív immunovizsgálatban. A tipikus vizsgálatban a fölös mennyiségben levő antitestet - poliklonális vagy monoklonális, előnyösen monoklonális - mely specifikusan kötődik az analithoz - egy szilárd fázison immobilizáljuk általában egy többüre-gü lemezben. Jelölt antigén standard koncentrációit keverjük össze az analit ismeretlen mennyiségeit tartalmazó minta higitási sorozataival. Az elkülönült higitásokat ezután immobilizált antitest hatásának tesszük ki, és mérjük a kötött jelölés mennyiségét. A jelölés nélküli analit jelölt analittal való kompetitív képességét használjuk fel a mintában levő analit mennyiségének kiszámítására.

Egy megvalósulásban a polimeráz próba egy B/C domén polinukleotid részét a kompetitív immunogénhez konjugáljuk. Ezután ezt a hibrid molekulát használjuk jelölt antigénként a supra leirtak szerint. A kompetitív kötés után polimerázt /a B domén promóterre specifikusat/ adunk hozzá és a transzkripciós terméket az I/A/ /supra/ részben leirtak azerint vizsgáljuk.

Egy másik megvalósulásban a multimer próba egy M domén polinukleotid részét konjugáljuk egy kompetitív immunogénhez. Ezt a hibrid molekulát használjuk ezután a supra leirt jelölt antigénként. A kompetitív kötődés után az M domén jelölt és a supra leirtak szerint meghatározzuk a mennyiségét.

A DNS-hez való immunogén párosításhoz az olyan homo-

bifunkcionális reagensek, mint a diszuczinimidil szuberát /DSS/, etilén-glikol bis /szuczinimidil-szukcinát//EGS/, vagy p-fenilén diizotiocianát /DITC/ valószínűleg sokkal hasznosabb párosítási módszerek, mint az I/A/ részben supra leírtak.

Az amplifikált immunvizsgálatok találmány szerinti elvégzésére szolgáló kitek csomagolt kombinációban a következő reagenseket tartalmazzák: egy szilárd fázist, mely vagy képes az antigén analitot kötni, vagy alternatív módon már rendelkezik egy kapcsolódó hozzárögzült első antitesttel, ha a vizsgálat formája olyan, melyben az analit indirekt módon kötődik a szilárd fázishoz egy kötött első vagy egy második antitesten keresztül; tetszés szerint kapcsoló második és harmadik antitesteket, melyek az analitra specifikusak és egy hibrid kötő próbát ha a vizsgálat formája olyan, melyben polinukleotid amplifikáló próbát használunk az amplifikáló próbát; a megfelelő DNS-irányított RNS polimerázt és immobilizált transzkripció befogó próbákat /ha polimeráz amplifikáló próbát használunk/; és egy megfelelő jelölő próbát. Ezek a reagensek szeparált tárolókban találhatóak a kitben. A kit tartalmazhat még hibridizációs puffereket, mosó oldatokat, negatív és pozitív kontrollokat és a vizsgálat kivitelezéséhez írásos utmutatót.

A következő példák szemléltető és nem korlátozó jellegűek. Az egyéb megvalósulások a találmány körén és szellemén belül egyértelműek lesznek a tudomány e területén jár-

tas szakember számára.

1. Példa

Immunovizsgálat a HCV antigén Humán szérumban való jelenlétének kimutatására

Ezt a tesztet a Hepatitis C virus C-100 antigénje jelenlétének közvetlen kimutatására terveztük. Az immunovizsgálat általános menetét supra írtuk le. A mikrotiter lemezeket első antigénként kecske-anti-egér antitestet használva készítettük elő. Ezt az antitestet 96 üregű mikrotiter lemez üregeiben immobilizáltuk. A második antitest egy egér monoklonális antitest, mely a HCV C-100 egy epitópjára specifikus. A HCV-re szkrinelendő egyénekből származó szérum hígítások duplikátjait blokkoló pufferben készítettük el és a mikrotiter lemez üregeiben nem fertőzött megfelelő kontrollokkal együtt inkubáljuk. A harmadik antitest poliklonális nyúl antitestek kombinációja, mely az egyes HCV antigéneket ismeri fel. Az utolsó antitest a hibrid T7 polimeráz amplifikáló próba. Az A domén polipeptid rész kecske-anti-nyúl antitestként funkcionál és kiegészíti az immunovizsgálati "szendvicset".

A T7 polimeráz próba hozzáadása után a C domén transzkripcióját úgy befolyásoljuk, hogy a komplexet a következőket tartalmazó 20 µl oldatban inkubáljuk: 40 mM Tris-HCl

/pH=8,0/, 20 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 1 mM Spermidin, 10 mM ditiotreitól, 0,15 mg/ml szarvasmarha szérum albumin, 1,25 mM rATP, rCTP, rGTP és rUTP, 1600 egység/ml RN-azin és 2000 egység/ml T7 RNS polimeráz. Ezt a keveréket 37°C hőmérsékleten 1 óráig inkubáljuk. A transzkripciót 8xSSC és 0,2% SDS-t tartalmazó 20 µl oldat hozzáadásával állítjuk le és a teljes keveréket átvisszük immobilizált befogó próbát /c₁/ szekvenciákkal/ tartalmazó új üregekbe. A C domén transzkriptek /3. ábra/ befogását befolyásoljuk azáltal, hogy 55 °C hőmérsékleten inkubáljuk 1 órán át, majd kétszer mossuk 0,1 x SSC-vel és 0,1% SDS-sel.

A C domén transzkripteket ezután jelöljük 50 fmol enzim-jelölt próba /c₂/ hozzáadásával 40 µl 4 x SSC-ben és 100 µg/ml poli A-ban 15 percig 55°C hőmérsékleten történő inkubálással. Végül a komplexet kétszer mostuk 0,1 x SSC-ben, 0,1% SDS-ben, melyet 0,1 x SSC-vel való kétszeri mosás követett.

Az AP detektáláshoz egy enzim által kiváltott dioxetán reakciót /a Lumigen Inc.-től származik/ /Schapp et al., /1987/ Tet. Lett. 28:1159-1162 és 4,857,652 számú US szabadalom/ alkalmazunk. A detektálási eljárás a következő: a jelölő lépéshez 20 µl HM puffert AP próbával adtunk az egyes üregekhez és az üregeket 55 °C hőmérsékleten 15 percig inkubáltuk. A felülusztót eltávolítottuk és az üregeket kétszer mostuk 380 µl 0,1 x SSC-vel és 0,1% SDS-sel. Ezután az üregeket kétszer mostuk 380 µl 0,1 x SSC-vel a ma-

radék SDS eltávolítása céljából. CTAB pufferben levő 20 μ l $3,3 \times 10^{-4}$ M dioxetánt adtunk az egyes üregekhez. Az üregeket óvatosan megütögettük, hogy a reagens lecsurogjon az aljukra és óvatosan megkevertük, hogy a reagens egyenletesen oszoljon el az üregek alján. Az üregeket letakartuk a mikrotiter lemez fedelével és 37°C hőmérsékleten inkubáltuk egy órán át. Az üregeket ezután luminométerrel olvastuk le és a mennyiséget az ismert mennyiségű antigénből készített standard görbéhez viszonyítva határoztuk meg.

2. Példa

A HCV antitest humán szérumban való jelenlétének immunovizsgálata

A mikrotiter lemezeket először a Hepatitis C vírusból származó HCV C-100 antigénnel burkoltuk. A burkoló puffert tartalmazó oldatot /50 mM Na-borát, pH=9,0, 21 ml/lemez/, BSA-t /25 μ g/ml/, a HCV C-100-at /2,50 μ g/ml/ közvetlenül a hozzáadás előtt készítettük el. Öt percig tartó keverés után 0,2 ml/üreg mennyiséget adtunk a lemezekhez az oldatból, lefedtük és 2 órán át 37°C hőmérsékleten inkubáltuk mely után az oldatot párologtatással távolítottuk el. Az üregeket 0,4 ml mosópufferrel /100 mM Na-foszfát, pH=7,4, 140 mM NaCl, 0.1% kazein, 1% /w/v/ Triton X-100, 0,01% /w/v/ Hibitane/ mostuk egyszer. A mosó oldat eltávolítása

után Postcoat oldat 200 µl mennyiségeit adtuk az üregekhez /10 mM Na-foszfát, pH=7,2, 150 mM NaCl, 0,1% /w/v/ kazein, 3% szacharóz és 2 mM fenilmetilszulfonilfluorid /PMSF// a lemezeket lazán lefedtük a párolgás gátlása céljából és 30 percig szobahőn hagytuk. Az üregeket ezután párologtattuk az oldat eltávolítása céljából és egy éjszakán át liofileztük a tálca melegítése nélkül.

Az immunvizsgálat elvégzéséhez a szérum minták vagy a kontrollok /20 µl/ higitásainak duplikátjait adtuk a 200 µl minta higitást tartalmazó üregekhez /100 mM Na-foszfát, pH=7,4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% /w/v/ kazein 0,01% /w/v/ Hhibitane, 1% /w/v/ Triton X-100, 100 µg/ml élesztőkivonat/. A lemezeket lefedtük és 37°C hőmérsékleten inkubáltuk 2 órán át, mely után az oldatot párologtatással távolítottuk el. Az üregeket háromszor mostuk 400 µl mosó pufferrel /0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS/.

A szérum minták hozzáadását követően az üregeket az 1. Példában leírtak szerint kezeljük, azzal az eltéréssel, hogy a harmadik antitestet /nyul-anti-analit/ nyul-anti-humán szérumra cseréltük.

3. Példa

Multimer próbák használata a HCV fertőzés detektálásában

A fenti két példa bármelyikében a polimeráz próbák

multimer próbákra cserélhető. Az összes lépés azonos az egyes példákban az amplifikáló próba hozzáadásáig, azzal az eltéréssel, hogy egy multimer próbát használunk a polimeráz próba helyett. Az amplifikáló próba kötődése után az M domén multimer alegységével alapjában véve homológ jelölt oligonukleotid szekvencia 50 fmol mennyiségét tartalmazó oldatot adtuk hozzá. Ezt az enzim jelölt próbát 40 μ l 4 x SSC, 100 μ g/ml poli A-ban 15 percre 55 °C hőmérsékleten adtuk hozzá. Végül a komplexet 2 x mostuk 0,1 x SSC, 0,1% SDS-ben, melyet 0,1 x SSC-vel való kétszeri mosás követett.

Az AP detektáláshoz az enzim által kiváltott dioxetán reakciót /A Lumigen Inc.-től származik/ /Schapp et al., /1987/ Tet.Lett. 28:1159-1162 és a 4,857,652 számú US szabadalom/ alkalmaztuk. A detektálási eljárás a következők szerint történik: A jelölő lépésben az AP próbát tartalmazó 20 μ l HM puffert adtuk az egyes üregekhez, majd ezeket 15 percig 55 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A felülusztót eltávolítottuk és az üregeket kétszer mostuk 380 μ l 0,1 x SSC-vel és 0,1% SDS-sel. Az üregeket ezután kétszer mostuk 380 μ l 0,1 x SSC-vel a maradék SDS eltávolítása céljából. CTAB pufferben levő 20 μ l $3,3 \times 10^{-4}$ M dioxetánt adtuk az egyes üregekhez. Az üregeket óvatosan megütögettük, hogy a reagens lecsurogjon az üregek aljára, majd óvatosan megkevertük, hogy a reagens egyenletesen oszoljon el az üregek alján. Az üregeket lefedtük a mikrotiter lemezek tejjével és 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk egy órán át.

Ezután az üregeket luminométerrel leolvastuk és a mennyiséget az ismert mennyiségű antigén standard görbéjéhez viszonyítva határoztuk meg.

4. Példa

A polinukleotid polimeráz próbák használata a HCV fertőzés detektálásában

Az 1. és 2. Példa bármelyikében a polinukleotid polimeráz próbák helyettesíthetők a hibrid polimeráz próbákkal. Az összes lépés azonos az egyes példákban a harmadik antitest hozzáadásáig, mely poliklonális nyul antitestek kombinációja, mely az egyes HCV antigéneket ismeri fel. Ezt követi egy hibrid kötő molekula 50 µl mennyiségének /0,2 M NaHCO₃-ban 20 µg/ml koncentrációban/ hozzáadása. Ez az inkubáció a korábbi antitestek inkubálási eljárásaival egyező módon történik. A hibrid kötő molekula rendelkezik egy első doménnel, mely egy anti-nyul antitestként funkcionál és kötődik az összes korábban kötött nyul harmadik antitesthez. A hibrid kötő második doménje egy 15 maradékkal rendelkező oligonukleotid, melynek szekvenciája alapján véve komplementer a polinukleotid polimeráz próba A doménjével. Inkubálás és mosás után a polimeráz próbát 50 µl hibridizációs pufferben /0,3 M NaCl, 0,1% NP-40/ hozzáadjuk és 60 percig 40 °C hőmérsékleten inkubáljuk.

Inkubálás után a feleslegben levő próbát eltávolítjuk és a komplexet háromszor mossuk a hibridizációs pufferrel. A B domén átíródik és a transzkripciót az 1. Példában leírtak szerint határozzuk meg.

5. Példa

A polinukleotid multimer próbák használata a HCV fertőzés detektálásában.

Ez a vizsgálat azonos a 4. Példában leírtakkal egészen a polinukleotid próba hozzáadásáig. A jelölő anyag M domén alegységeihez való ezt követő hibridizációja és a jelölő anyag mennyiségi meghatározása ugyanolyan mint a 3. Példában leírtaké.

6. Példa

A polinukleotid multimer próba használata az immobilizált humán IgG detektálásában

Egy "fésű-szerűen" elágazó polinukleotidot, mely 15 különböző oldallánccal rendelkezik, melyek mindegyike hárcom a jelölt próbával komplementer helyet /összesen 45/ és egy a gerinchez kapcsolódó terminális biotin molekulát tartalmaz a fent leírtak szerint készítettük el.

A humán IgG különböző koncentrációit szilárd támasztékon immobilizáltuk. Az immobilizált IgG-t biotinizált, affinitással tisztított kecske anti-humán IgG-vel /a biotin koncentráció 40 ng/ inkubáltuk és a fölös antiszérumot kimostuk a támasztékból. A támasztékot ezután 200 ng avidin-D-vel majd 100 fmol vagy 500 fmol "fésű-szerűen" elágazó polinukleotiddal inkubáltuk megfelelő mosásokkal. A támasztékot ezután torma-peroxidázzal jelölt oligonukleotid próbával inkubáltuk, mely komplementer volt a polinukleotidon levő jelölt próba kötő helyekkel. Az optikai denzitást /O.D./ 492/620 nm hullámhosszon olvastuk le.

Összehasonlítás céljából a fentiek szerint végeztünk vizsgálatokat olyan polinukleotiddal, mely csupán egy jelölt próba kötő hellyel rendelkezett.

Az alábbi táblázat ezen tesztek eredményeit mutatja:

Humán IgG koncentráció /ng/ml/	45 hely 100 fm	egy hely 100 fm	45 hely 500 fm	egy hely 500 fm
100	1.116	0.005	2.505	0.002
50	1.089	0.002	1.564	0.001
25	0.432	0.001	1.295	0.001
12.5	0.303	0.001	0.451	0

Ahogy arról beszámoltunk, 45 helyes polinukleotid sokkal erősebb jelet biztosít, mint az egyedüli hellyel rendelkező polinukleotid.

Az immunovizsgálati módszerekhez használt, a találmányban leírt különböző amplifikáló próbák más változatai és alkalmazásai egyértelműek a tudomány e területén jártas szakember számára és ezek a találmány tárgyát képezik és a találmány körén belül találhatók.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy molekuláris próba, melyet egy jel amplifikálóként használunk immunvizsgálatokban azzal jellemezve, hogy

/a/ egy első domént /A/ - mely egy polipeptid és és egy ismert antigénre specifikus antitestként működik - tartalmaz;

/b/ egy második domént /B/ - mely egy olyan kettős-szálu polinukleotid, mely egy DNS-függő RNS polimeráz enzim aktivitás promótereként képes működni - tartalmaz; és

/c/ egy harmadik domént /C/ - mely vagy egyszálu, vagy kétszálu és a második doménnel oly módon szomszédos, hogy a harmadik domén a második domén promóter aktivitásához templátként képes funkcionálni - tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a DNS-függő RNS polimeráz aktivitás a T7 bakteriofágból származik.

3. Az 1. vagy 2. igénypontok szerinti próba azzal jellemezve, hogy a második B domén legalább 10 de 40-nél kevesebb nukleotidból áll.

4. A 3. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a harmadik C domén legalább 30 de 80-nál kevesebb nukleotidból áll.

5. A 2. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a polimeráz aktivitás a T7 bakteriofágból származik és a

második B domén szekvenciája a következőkből áll:

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'

3'-ATT ATG CTG AGT GAT AT-5'

6. A 2. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a polimeráz aktivitás a T7 bakteriofágból származik, melyben a második domén nukleotid szekvenciája a következőkből áll:

5'-CTG GCT TAT CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'

3'-GAC CGA ATA GCT TTA ATT ATG CTG AGT GAT AT-5'

7. Az 1., 2., 3., 4., 5. vagy 6. igénypontok szerinti próba azzal jellemezve, hogy a harmadik C domén nukleotid szekvenciája felső száljának 5' maradéka szomszédos a második B doménnal és egy guanozin maradékot jelöl.

8. Az 1., 2., 3., 4., 5., 6., vagy 7. igénypontok szerinti próba azzal jellemezve, hogy a harmadik C domén szekvenciája a következőkből áll;

5'-GGG AGA TGT GGT TGT CGT ACT TAG CGA AAT ACT GTC CGA GTC G-3'

3'-CCC TCT ACA CCA ACA GCA TGA ATC GCT TTA TGA CAG GCT CAG C-5'

9. A 8. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a második B domén DNS nukleotid szekvencia felső száljának 3' vége a C domén nukleotid szekvencia felső száljának 5' végéhez kapcsolódik.

10. Az 1. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy

a harmadik C domén transzkriptje két aldóment tartalmaz:

/a/ egy első aldóment, a c_1 -et, mely képes egy oligonukleotid befogó kötőhöz hibridizálódni, a befogó kötő képes egy szilárd szubsztráton immobilizált polinukleotidhoz hibridizálódni; és

/b/ egy második aldóment, a c_2 -öt, mely képes egy oligonukleotid jelölő linkerhez kötődni és a jelölő linker egy mennyiségileg meghatározható próbához kötődni.

11. Az 1. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy egy olyan funkcionális egység, mely tartalmazza a második és a harmadik doméneket a B-t és C-t, többszörös ismétlődő egységekben szerepel.

12. Eljárás egy immunológiai vizsgálatban egy detektálható jel amplifikálására azzal jellemezve, hogy

/a/ egy biokémiai molekuláris próbát közvetlenül vagy közvetve kapcsolunk egy analithoz, mely próba tartalmaz egy kötő /A/ domént egy második /B/ domént, mely egy a DNS-függő RNS polimeráz enzim aktivitás promótereként funkcionálni képes kétszálu DNS szekvencia és egy harmadik /C/ domént, mely vagy egyszálu vagy kétszálu és a B doménnel oly módon szomszédos, hogy a harmadik domén a második domén promóter aktivitásának templátjaként képes funkcionálni;

/b/ a nem kötött próbát eltávolítjuk;

/c/ a DNS-függő RNS polimeráz aktivitáson keresztül

a próba szerkezet harmadik /C/ doménjének c' templát szekvenciájával komplementer RNS oligomer számos kópiáját transzkriptáljuk ; és

/d/ az RNS transzkripteket mennyiségűleg meghatározzuk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az analitot először közvetve vagy közvetlenül egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk.

14. A 12. vagy a 13. igénypontok szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az A domén egy antitestként funkcionálni képes polipeptid és a próba az analithoz közvetve vagy közvetlenül az A doménon keresztül kapcsolódik.

15. A 12. vagy 13. igénypontok szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy

/a/ a próba A doménje egy egyszáлу polinukleotidként van jelen; és

/b/ az analit a molekuláris próbához egy protein/polinukleotid hibrid kötő molekulán keresztül kapcsolódik, mely a következő két doménnel rendelkezik:

/i/ egy első doménnel; mely egy olyan egyszáлу polinukleotid szekvencia, mely alapján véve a próba A doménjének szekvenciájával komplementaritást mutat; és

/ii/ egy második doménnel, mely az analitra specifikus antitestként vagy az analitra specifikus antitest egy epitópjaként funkcionál.

16. A 12.,13.,14 vagy 15. igénypontok szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a második /B/ domén a T7 bakteriofág DNS-függő RNS polimerázából származik.

17. A 12.,13.,14.,15.,vagy 16 igénypontok szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy

/a/ a próba harmadik /C/ doménjét a jelölt ribonukleotid trifoszfátok jelenlétében transzkriptáljuk;

/b/ a harmadik domén transzkriptjei egy első aldoménnel a c_1 -gyel rendelkeznek, mely egy szilárd szubsztráton immobilizált oligonukleotid belógó próbával komplementaritást mutat; és

/c/ az említett transzkripteket immobilizáljuk és mennyiségileg meghatározzuk.

18. A 12.,13.,14.,15 vagy 16 igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy

/a/ az első próba harmadik /C/ doménjét biotinizált ribonukleotid trifoszfátok jelenlétében transzkriptáljuk;

/b/ a harmadik domén transzkriptjei rendelkeznek egy első aldoménnel a c_2 -vel, mely egy jelölt oligonukleotid próbával komplementaritást mutat;

/c/ a transzkripteket egy avidinilált szilárd szubsztráton immobilizáljuk; és

/d/ a transzkripteket mennyiségileg meghatározzuk.

19. A 12.,13.,14.,15., vagy 16. igénypontok szerinti el-

járás azzal jellemezve, hogy

/a/ a próba harmadik C doménjét jelölt és biotinizált ribonukleotid trifoszfátok jelenlétében transzkriptáljuk;

/b/ a transzkripteket avidinált szilárd szubsztráton immobilizáljuk; és

/c/ a transzkripteket mennyiségileg meghatározzuk.

20. A 12.,13.,14.,15 vagy 16. igénypontok szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy

/a/ a próba harmadik C doménjének transzkriptje két aldoménnel rendelkezik

/i/ az első aldomén, a c_1 , azzal jellemezve, hogy egy oligonukleotid befogó próbával komplementer, a befogó próbát egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk.

/ii/ a második aldomén, a c_2 , azzal jellemezve, hogy egy jelölt oligonukleotid próbával komplementer;

/b/ a transzkriptet egy befogó próbához hibridizáltatjuk; és

/d/ a jelölt próbát mennyiségileg meghatározzuk.

21. A 12. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az első próba második és harmadik doménjeit a B-t és C-t tartalmazó egység többszörös ismétlődő B/C egységekben van jelen.

22. Egy molekuláris próba jel amplifikálóként való haszná-

lata immunvizsgálatokban azzal jellemezve, hogy tartalmaz /a/ egy első domént /A/, mely egy antitestként működni képes polipeptidet tartalmaz, mely egy ismert analithoz specifikusan kötődik; és

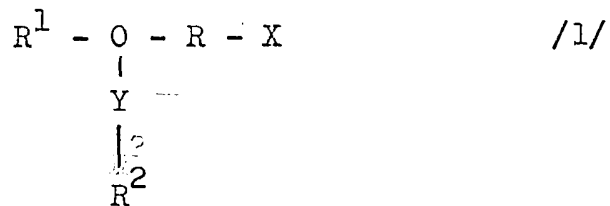
/b/ egy második domént /M/, mely egyszáлу oilgonukleotid alegységeket tartalmaz, melyek egy kérdéses egyszáлу nukleinsav szekvenciához specifikusan képesek kötődni.

23. A 22. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a második domén /M/ minden oligonukleotid egysége 15-50 bázist tartalmaz megközelítően és GC tartalma a 40-60% tartományba esik.

24. A 22. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a molekula lineáris szerkezettel rendelkezik.

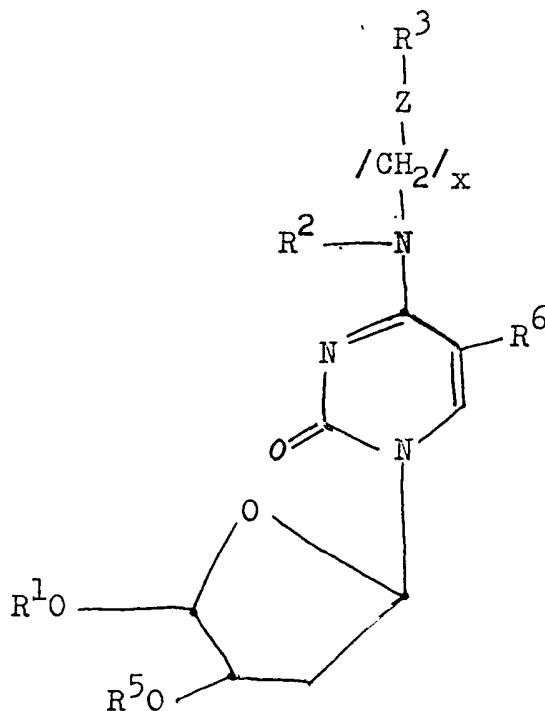
25. A 22. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a molekula elágazó szerkezettel rendelkezik.

26. A 22. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy a második domén oligonukleotid alegységének legalább egy része egy a következő képlettel rendelkező vegyületből származó sokfunkciós egységen keresztül kötődik.



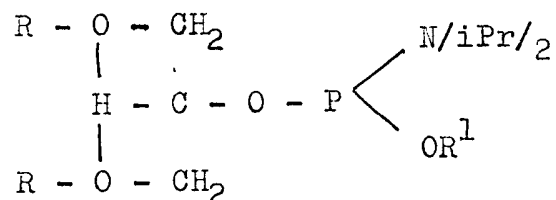
ahol R egy szerves rész, előnyösen egy nukleinsav; R^1 egy hidroxil védő csoport, mely eltávolítható olyan körülmények között, mely alatt a szintetikus nukleinsav nem válik le a szilárd fázisról és nem válnak le az exociklikus nitrogén vagy foszfát védő csoportok; X egy foszfort tartalmazó csoport, mely elősegíti a nukleinsav szintézisét; Y egy nukleofil csoportból származó gyök; és R^2 R^1 -gyel azonos vagy egy blokkoló vagy egy védő csoport, mely eltávolítható és úgy helyettesíthető hidrogénnel, hogy az R^1 -rész nem befolyásolja.

27. A 22. igénypont szerinti próba azzal jellemezve, hogy az oligonukleotid alegység legalább egy része a következő képlettel rendelkező vegyületből származó többfunkciós egységen keresztül kapcsolódik:



ahol Z egy nukleofil; R^1 egy olyan védő csoport, mely általában bázis-stabil és sav-érzékeny, R^2 hidrogén vagy metil; R^3 egy védő csoport, mely eltávolítható és hidrogénnel helyettesíthető, anélkül, hogy R^1 -et befolyásolná; R^5 egy foszfor származék, mely lehetővé teszi egy oligonukleotid lánc 5' pozíciójához való nukleotidok addícióját kémiai szintézisen keresztül; R^6 metil, hidrogén, I, Br, vagy F és X egy 1-8-ig terjedő egész szám, az egyet és a 8-at is beleértve.

28. A 22. igénypont szerinti próba azzal jellemelve, hogy az oligonukleotid alegységek legalább egy része a következő képlettel rendelkező többfunkciós egységen keresztül kapcsolódik:



ahol R az említett hidroxil védő csoport; iPr izopropil; és R^1 metil vagy béta-cianoetil.

29. Eljárás egy detektálható jel amplifikálására, melyet egy immunvizsgálatban egy antigén detektálására és mennyiségi meghatározására használunk, azzal jellemezve, hogy

/a/ egy analithoz közvetve, vagy közvetlenül kötünk egy biokémiai molekuláris próbát, mely tartalmaz egy kötő domént /A/, egy második domént /M/, mely számos egy-

száлу DNS oligomer alegységet tartalmaz, melyek képesek egyszálu jelölt oligonukleotidhoz hibridizálódni;

/b/ a nem kötött próbát eltávolítjuk

/c/ egyszálu jelölt oligonukleotidokat hibridizálunk, melyek egy olyan nukleotid szekvenciát tartalmaznak, mely alapján véve komplementer az M domén próba alegység szekvenciájával és a második domén alegységeivel;

/d/ a nem kötött jelölt oligonukleotidot eltávolítjuk és;

/e/ a próbához kötődő jelölt oligonukleotidok mennyiségét meghatározzuk.

30. A 29. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az analitot először közvetlenül vagy közvetve egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk.

31. A 30. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az A domén egy olyan polipeptid, mely képes antitestként funkcionálni és az analithoz közvetlenül vagy közvetve az A doménon keresztül kötődik.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az A domén polipeptidje az analithoz specifikusan kötődő antitest egy epitópjához specifikusan kötődik.

33. A 29. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy

/a/ a próba A doménje egy egyszálu polinukleotid;

és

/b/ az analit közvetve kötődik a molekuláris próbához egy protein/polinukleotid hibrid kötő molekulán keresztül, mely két doménnel rendelkezik:

/i/ egy első doménnel, mely egy olyan egyszá-
 lu polinukleotid szekvencia, mely alapján véve komple-
 menter a próba A doménjének szekvenciájával; és

/ii/ egy második doménnel, mely egy az analit-
 rá specifikus antitestként funkcionál.

34. Egy összehasonlító immunvizsgálásban egy detektálha-
 tó jel amplifikálásának módszere azzal jellemezve, hogy

/a/ létrehozunk egy molekuláris próbát, mely tar-
 talmaz:

/i/ egy első domént /A/, mely immunogénként ké-
 pes funkcionálni;

/ii/ egy második domént /B/, mely egy a DNS-
 függő RNS polimeráz enzim aktivitás promótereként funkci-
 onálni képes kétszálu polinukleotidot jelent;

/iii/ egy harmadik domént /C/, mely vagy egy-
 szálu vagy kétszálu és a második doménnel szomszédos oly-
 módon, hogy a harmadik domén a második domén promóter ak-
 tivitásának templátjaként képes funkcionálni.

/b/ a próbát konkurens analit jelenlétében köz-
 vetlenül vagy közvetve egy szilárd szubsztráton immobili-
 záljuk;

/c/ a nem kötött próbát eltávolítjuk;

/d/ egy DNS-függő RNS polimeráz aktivitáson keresztül a próba szerkezet harmadik C doménje templát szekvenciájával /c'/ komplementer RNS oligomerekből számos kópiát transzkriptálunk;

/e/ az RNS transzkriptek mennyiségét meghatározzuk.

35. Egy összehasonlító immunvizsgálatban egy detektálható jel amplifikálásának módszere azzal jellemezve, hogy

/a/ létrehozunk egy molekuláris próbát, mely tartalmaz:

/i/ egy első domént /A/, mely immunogénként képes funkcionálni; és

/ii/ egy második domént /M/, mely számos olyan egyszáлу oligonukleotid alegységet tartalmaz, melyek képesek a kérdéses egyszáлу nukleinsav szekvenciához specifikusan kötődni;

/b/ a próbát egy versenyképes analit jelenlétében közvetve vagy közvetlenül egy szilárd szubsztráton immobilizáljuk;

/c/ a nem kötött próbát eltávolítjuk;

/d/ a második domén alegységeihez, az M domén próba alegység szekvenciájával alapjában véve komplementer nukleotid szekvenciát tartalmazó egyszáлу jelölt oligonukleotidokat hibridizálunk;

/e/ a nem kötött jelölt oligonukleotidokat eltávolítjuk; és

/f/ a próbához kötött jelölt oligonukleotid mennyiségét meghatározzuk.

A meghatalmazott

66 oldal
+ 11 ábrásoldal

77 oldal

Re¹

Dr. Szentpéteri Ádám
Szabadságharcosok
az S.E.A. és E. Hírszerzők Szövetségétől
Székhely: 1053 Budapest, Szabadság tér 10.
Telefon: 155-3723, fax: 155-3564

3225/92

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

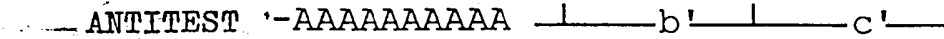
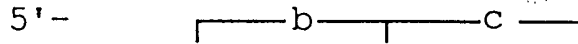
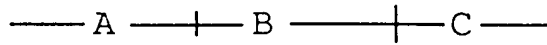


1/23

54623

1/11

A -



B -

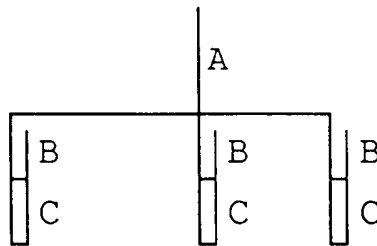
< A > < B (T7PROMOTER) >

5'-TTTTTTTTTCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATA...

ANTITEST-3'-AAAAAAAAAGACCGAATAGCTTTAATTATGCTGAGTGATAT...

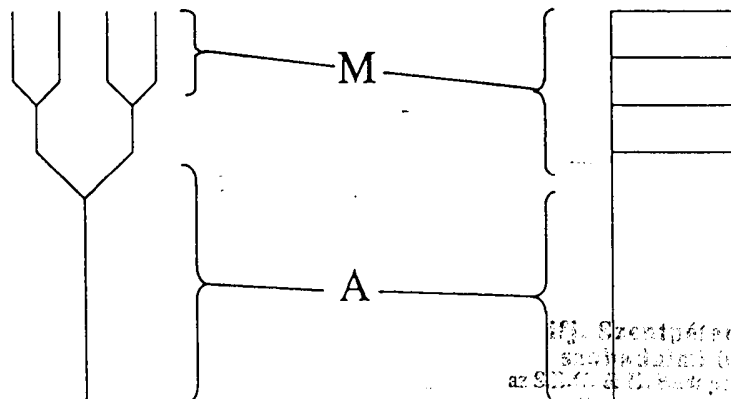
< C (ÁTÍRT RÉGIÓ) >
...GGGAGATGTGGTTGTCGTACTTAGCGAAATACTGTCCGAGTCG
...CCCTCTACACCAACAGCATGAATCGCTTTATGACAGGCTCAGC
template. szál

C -



D -

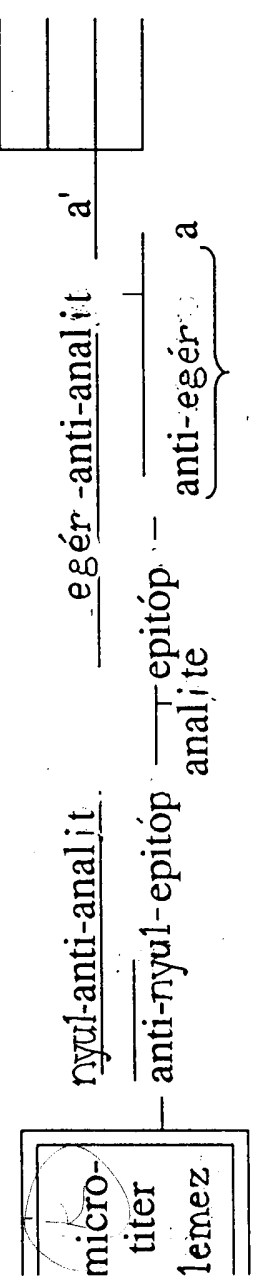
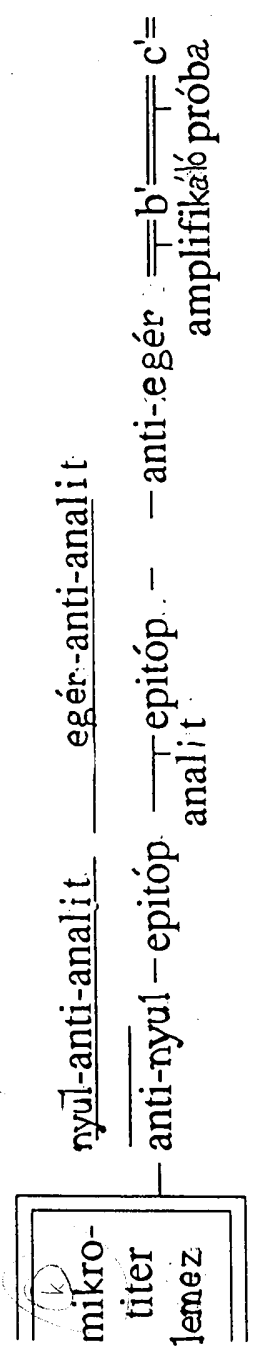
Elágazó
multimer



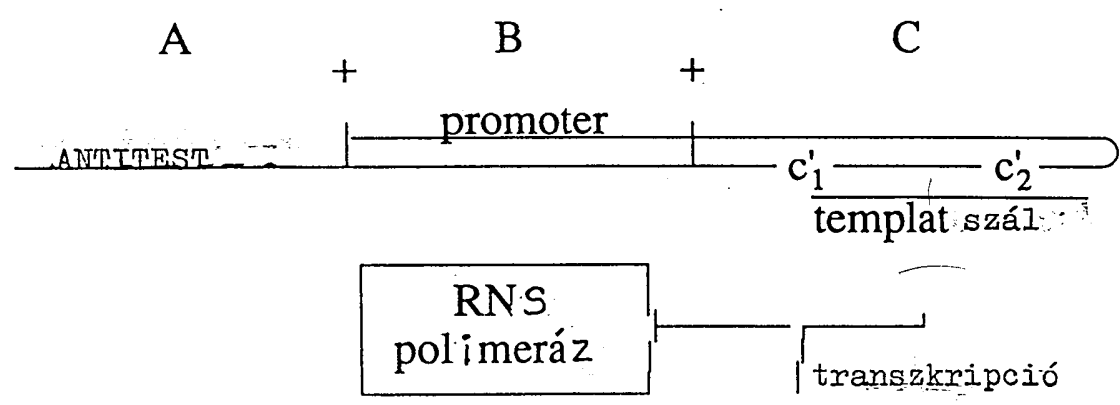
Fésű-szerű
multimer

Dr. Szentpéteri Ágoston
székhely: Budapest, Széchenyi utca 13.
H-1061 Budapest, Velekeny utca 13.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3364

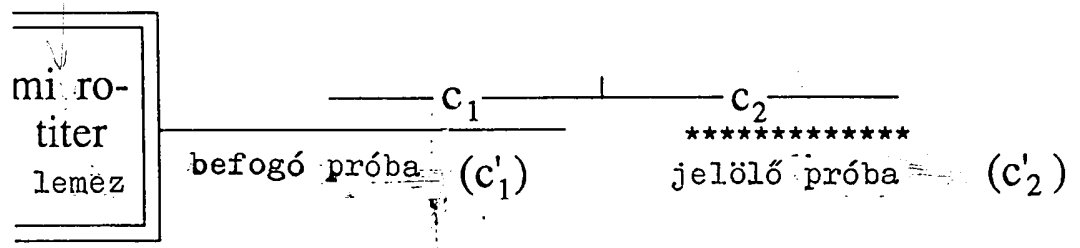
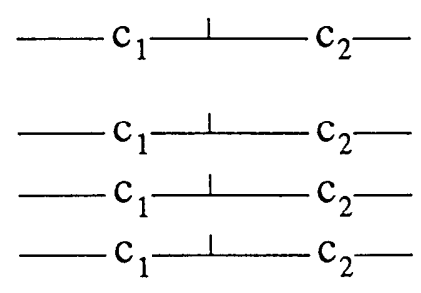
1. ÁBRA



2. ÁBRA

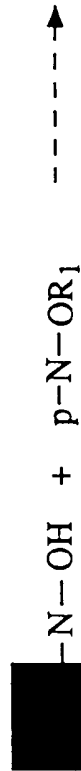


RNS
transzkriptek

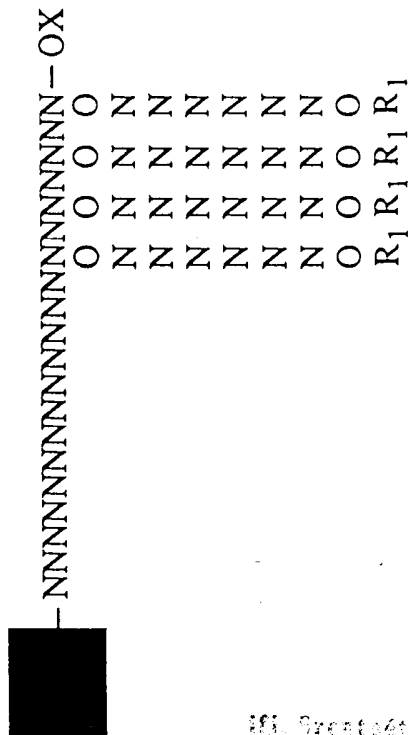
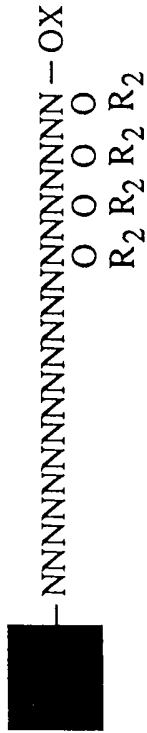
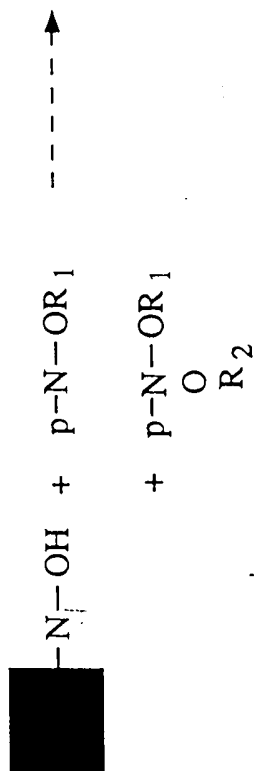


3. ÁBRA

A. Lineáris szintetikus DNS



B. áztágazó DNS, fésűs szerkezet

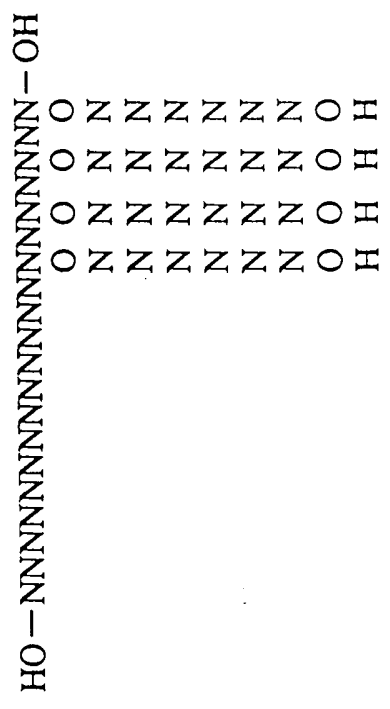
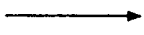


4a. ÁBRA

2070

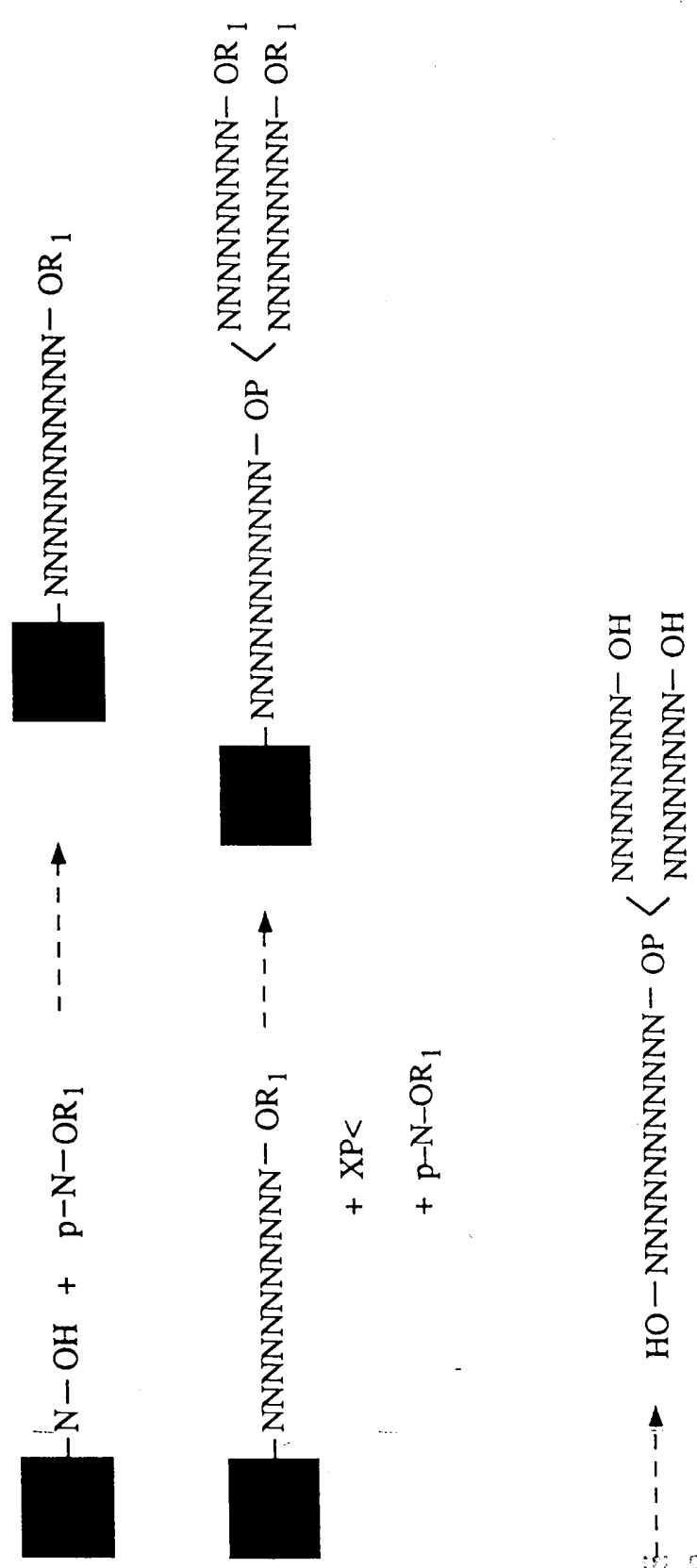
5/11

4b. ÁBRA



Dr. György Ádám
 Kémiai Intézet
 1135 Budapest, Eötvös út 15. sz. 10.
 Telefon: 199-3720, Fax: 199-3664

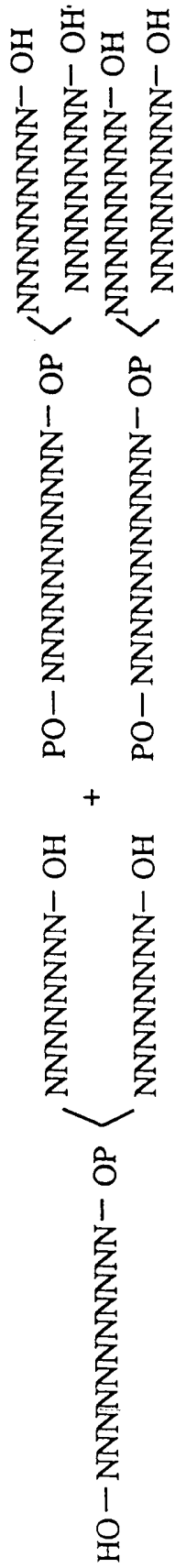
C.Szétágazó DNS, Villás szerkezet



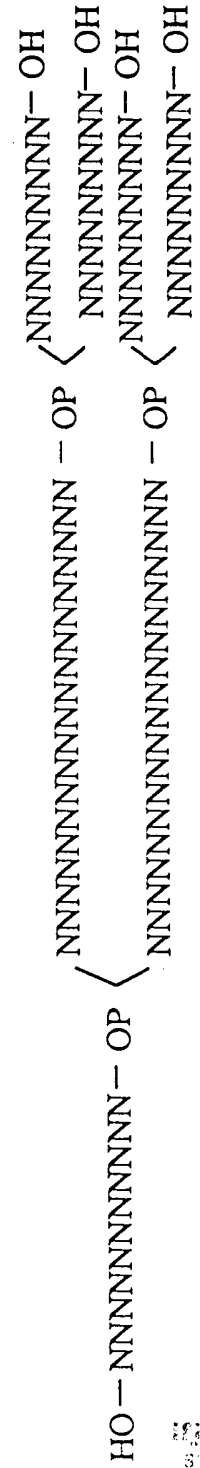
4c. ÁBRA

Dr. Csontosné Ágnes
 Széchenyi Emlékező
 Állami Széchenyi Tudományi
 Kutatóközpont
 H-1961 Budapest, Fülöp utca 10.
 Telefon: 153-3733, Fax: 153-2664

D. Többszörös villák /oldal összeépítés során/



- 1) A T₄ ligázként használt kötő linker
- 2) Kémiai ligálás is lehetséges.



4d. ÁBRA

Építési és Szerkezetépítési
Szakmérnöki Iroda
az S.T.C. & T. Vagyontulajdonosi Rt.-nek
Közvetítői Iroda
H-1061 Budapest, Balatonszer 10.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-1654

375

2000

11/11

HO — NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN — OH
O N N N N N N N N O X
O N N N N N N N N O X

4h. ÁBRA

Dr. Szendrői Ádám
szabványi osztály
az S.O. Sz. L. Rt. és a Magyar
Szabványügyi Társaság
H-1091 Budapest, Kelenföldi u. 10.
Telefon: 153-3734, Fax: 153-3654