



HU000228049B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 049**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 01 03177**(22) A bejelentés napja: **1999. 06. 24.**(40) A közzététel napja: **2001. 12. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2012. 09. 28.**(51) Int. Cl.: **G01N 335/43** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/DK 99/00362

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 9967642

(30) Elsőbbségi adatok: PA 1998 00821 1998. 06. 24. DK	(73) Jogosult(ak): Alk-Abelló A/S, Horsholm (DK)
(72) Feltaláló(k): Morkeberg, Rikke, Nörum (DK) Bogestrand, Soren, Kokkedal (DK) Beck, Tine Charlotte, Birkerød (DE) Johansen, Niels, Allerød (DK) Ipsen, Hans-Henrik, Hillerød (DK)	(74) Képviselő: dr. Gárdonyi Zoltánné, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Eljárás ellenanyag kimutatására folyadékmintából**

(57) Kivonat

A találmány egyének immunológiai állapotának kiértékelésére szolgáló eljárásra vonatkozik, amely szerint 1) meghatározzák az egyéntől származó folyadékmintában az ellenanyag-tartalmat olyan immunvizsgálat alkalmazásával, amelyben a mintában található ellenanyag, valamint egy antigén, egy ellenanyag vagy haptén formájában jelenlévő ligandum - amely ligandum a mintában található ellenanyag Fab-régiója ellen irányul - közötti reakció megy végbe a minta egyéb összetevőinek a jelenlétében, így megkapják az 1. mérés eredményét, 2) meghatározzák az egyéntől származó folyadékmintában az ellenanyag-tartalmat olyan immunvizsgálat alkalmazásával, amelyben a mintában található ellenanyag, valamint egy antigén, egy ellenanyag vagy haptén formájában jelenlévő ligandum - amely a mintában található ellenanyag Fab-régiója ellen irányuló ligandum - közötti reakció megy végbe a minta egyéb összetevőinek a jelenléte nélkül, így megkapják a 2. mérés eredményét, továbbá összevetik az 1. és 2. mérés eredményét, így megkapják az interferencia mértékét, amely paraméterként alkalmazható az egyén immunológiai állapotának kiértékelésére.

Eljárás ellenanyag kimutatására folyadékmintából

A találmány tárgyát eljárás képezi specifikus ellenanyag kimutatására folyadékmintából.

A WO94/11734 számú nemzetközi közzétételi irat egy két-kötőhelyes, ellenanyag kimutatására alkalmas immunvizsgálatot ismertet kemilumineszcens jelölőanyag és biotinhoz kapcsolt ligandum alkalmazásával, amely eljárás az alábbi lépéseket tartalmazza: a) a folyadékmintát elegyítik biotinhoz vagy annak funkcionális származékához kapcsolt, antigén-, ellenanyag- vagy haptén-ligandummal, a kimutatni kívánt ellenanyag elleni, paramágneses részecskékhez kapcsolt ellenanyaggal, valamint egy avidinnel, streptavidinnel vagy azok funkcionális származékával kapcsolt kemilumineszcens akridinium-vegyülettel, hogy szilárd fázisú komplex képződjön; b) mágneses úton elválasztják a szilárd fázist a folyadék fázistól; c) kemilumineszcens reakciót - ha van ilyen - indukálnak az elválasztott szilárd fázisban, majd d) vizsgálják az elválasztott szilárd fázist a mintából kimutatni kívánt ellenanyag jelenlétére utaló kemilumineszcens fázisra nézve.

Ez, a technika állása szerint ismert eljárás különösen alkalmas olyan specifikus immunglobulinok koncentrációjának mérésére testnedvekből, mint például az IgD, IgE, IgG, IgM és azok alosztályai.

Ez, a technika állása szerint ismert eljárás alkalmas továbbá egy osztályba vagy alosztályba, például IgA, IgD, IgE, IgG, IgM és azok alosztályaiba tartozó immunglobulinok teljes mennyiségének kimutatására és mennyiségi meghatározására.

Ennek, a technika állása szerint ismert eljárásnak az elő-

nyős megvalósítási módja szerint, a szilárd fázisú komplex két lépésben képződik, azaz az első lépésben a mintát elegyítik biotinnal kapcsolt antigén-, ellenanyag- vagy haptén-ligandummal, valamint paramágneses részecskékkel kapcsolt ellenanyaggal, hogy egy első szilárd fázisú komplex képződjön, majd a második lépésben az első szilárd fázisú komplexhez kemilumineszcens akridium-vegyületet adnak, hogy egy második szilárd fázisú komplex képződjön.

Azonban a technika állása szerint ismert eljárás gyakorlatba vétele során kiderült, hogy az eljárás bizonyos alkalmazásaiban a mérni kívánttól eltérő immunglobulin típusok és/vagy más típusú, immunológiailag aktív szérumkomponensek részéről interferencia lép fel, amely a kapott eredményekben hibákhoz vezet.

A "Capture assay for specific IgE" szakirodalmi hely [V. Olivieri és munkatársai: *Journal of Immunological Methods* 157, 65-72 (1993)] allergiás egyének szérumából történő specifikus IgE mérésére alkalmas vizsgálatot ismertet, humán IgE elleni monoklonális ellenanyag (mikrotitráló lemez mélyedéseiben rögzítve) és oldatban lévő, biotinilált allergének alkalmazásával. Az IgE molekulák egyetlen inkubálás alatt Fc-fragmensükön keresztül a szilárd fázishoz kötődnek, míg a biotinilált allergének a specifikus IgE Fab régióikkal reagálnak. Egy második lépésben streptavidin-tormaperoxidáz konjugátumot adnak hozzá, hogy kimutassák a szilárd fázishoz kötődő biotin mennyiségét. A szerzők tanulmányozták a nem-specifikus IgE magas szintje, valamint allergén-specifikus IgG okozta interferencia lehetőségét, és megállapították,

hogy a vizsgálatra nincs hatással az allergén-specifikus IgG.

A WO98/16829 számú nemzetközi közzétételi irat ismerteti egy vizsgálatot, amely szerint egy anti-immunglobulint rögzítenek mikrotitráló lemez mélyedéseiben, amelyeket aztán mosnak. Ezután bemérik a vizsgálni kívánt szérumot, hogy a kívánt immunglobulin-típusnak a vizsgálati mintában található teljes mennyiségét megkössék. Ezután a biológiai folyadékmintát leszívják és a lemezt mossák. A mikrotitráló lemezhez kötődött ellenanyagot biotinilált antigénnel reagáltatják, a lemezt mossák, majd streptavidin/alkalikus-foszfataz konjugátumot mérnek be, majd újra mossák a lemezt. Ez, a technika állása szerint ismert vizsgálat alkalmazható *H. pylori* fertőzés standard antibiotikum-terápiájának követésére.

A találmány célja egyrészt egy olyan típusú eljárás kifejlesztése, amely szerint a megcélzott ellenanyagot egy szilárd részecskéhez kapcsolt, Fc-re irányuló ellenanyaggal és egy Fab-ra irányuló ligandummal visszük komplexbe, amely eljárás mentes a fent ismertetett módszerek azon hátrányától, hogy a vizsgálati minta más komponensei interferálnak a mérés során.

Ezt a célkitűzést a találmány értelmében, az 1-6. igénypontokban definiált eljárással érjük el oly módon, hogy az intermedier szilárd fázisú komplexet, amely a reagáló ellenanyagot hordozó részecskéket és a minta-ellenanyagot tartalmazza, a találmány egy új vonása értelmében a ligandum hozzáadása előtt egy további szeparálásnak és mosásnak tesszük ki.

A találmány szerinti eljárás azon a felismerésen alapszik, hogy ilyen további szeparálási és mosási lépés beiktatásával eltávolítjuk a folyadékmintából a potenciálisan interferáló

főlöslleges anyagot, valamint a potenciálisan interferáló főlős (ii) komponenst a rendszerből, ezáltal megszüntetjük annak a kockázatát, hogy ezek a faktorok interferáljanak a további lépések során. Meglepődve tapasztaltuk, hogy egy további szeparálási és mosási lépés beiktatása lényegesen csökkentette, és bizonyos esetekben eliminálta az immunológiailag aktív szérumkomponensek különböző típusai közötti interferencia technikai problémáját.

Az elért interferencia-csökkenés számos módszertani előnyt foglal magába. Elsősorban lehetővé teszi ellenanyagok elegyének bonyolult és előre nem jelezhető arányával rendelkező, problematikus szérumok pontosabb mérését. Ezenkívül elkerülhetjük egy ellenanyag téves pozitív minősítését. Továbbá, az interferencia csökkenése lehetővé teszi pontos mérések elvégzését a technika állása szerint ismert eljárásoknál szélesebb ellenanyag-koncentrációtartományban.

A találmány célja másrészt olyan eljárás kifejlesztése, amely alkalmas egy specifikus allergia-vakcinázás ("Specific Allergy Vaccination", SAV) hatásának kiértékelésére és/vagy előrejelzésére.

Ezt a célkitűzést a találmány értelmében a 7-12. igénypon-
tokban definiált megoldással érjük el oly módon, hogy a SAV-
kezelés hatásának kiértékelésénél és/vagy előrejelzésénél pa-
raméterként az immunológiailag aktív szérumkomponensek, pl.
ellenanyagok különböző típusai közötti interferencia szint-
jét, természetét és időbeli fejlődését alkalmazzuk. Meglepe-
téssel tapasztaltuk, hogy ezek a paraméterek értékes informá-
ciókat hordoznak egyének immunológiai állapotáról, valamint

adott, kiválasztott kezelési rendre adott válaszáról.

A találmány célja ezenkívül egyének immunológiai állapotának kiértékelésére alkalmas eljárás kifejlesztése.

Ezt a célkitűzést a találmány értelmében a 20-31. igénypontokban definiált megoldással érjük el oly módon, hogy egyének immunológiai állapotának értékelésénél, különösen allergia-kezelés hatásának kiértékelésénél és/vagy előrejelzésénél, allergia-vakcinázási kezeléseknél vagy a SAV-kezelés hatásának kiértékelésénél és/vagy előrejelzésénél paraméterként az immunológiailag aktív szérumkomponensek, pl. ellenanyagok különböző típusai közötti interferencia szintjét, természetét és időbeli fejlődését alkalmazzuk. Meglepetéssel tapasztaltuk, hogy ezek a paraméterek értékes információkat hordoznak egyének immunológiai állapotáról, valamint adott, kiválasztott kezelési rendre adott válaszáról.

A találmány célja továbbá olyan eljárás kifejlesztése, amellyel kiértékelhetjük egyének allergia-kezelésének a hatását.

Ezt a célkitűzést a találmány értelmében a 32-35. igénypontokban definiált megoldással érjük el, amely azon a felismerésen alapszik, hogy az 1., A. és C. alvizsgálatokkal (lásd a 20., 21. és 29. igénypontokat) végzett mérés, azaz egy olyan mérés, amelyet a mintában található interferáló faktork jelenlétében végzünk, különösen alkalmas allergia-kezelés, allergia-vakcinázási kezelés és specifikus allergia-kezelés (SAV) hatásának a kiértékelésére. Ennek megfelelően, az ezen eljárással elért mérési eredményt olyan körülmények mellett kapjuk, amelyek megfelelnek az *in vivo* körülmények-

nek, tehát fiziológiailag és klinikailag inkább releváns mérési eredmény a kezelések hatásának a kiértékelésére.

A találmány szerinti megoldás egy előnyös megvalósítási módja azzal jellemezhető, hogy az (r') , (r) vagy (r'') lépések (iii) komponensét, valamint az (s') , (s) vagy (s'') lépések (iv) komponensét egyetlen műveletben adagoljuk.

A találmány egy alternatív megvalósítási módja azzal jellemezhető, hogy az (r') , (r) vagy (r'') lépések során képződött háromkomponensű szilárdfázisú komplexet, mielőtt kitesszük az (s') , (s) vagy (s'') lépéseknek, mossuk, hogy eltávolítsuk a komplexben nem kötött vegyületeket.

A specifikus allergia-vakcinázást (SAV), korábbi elnevezéssel specifikus immunterápiát vagy hiposzzenzibilizálást mintegy száz éve alkalmazzák 1-es típusú, IgE-mediálta allergiás betegségek kezelésére.

A SAV-eljárással elérhető általános előnyök a következők: a) allergiás szimptómák és gyógyszerfogyasztás csökkenése, b) allergénnel szembeni javult tolerancia a szemeken, orrban és tüdőben és c) csökkent reakciók a bőrön (korai és késői fázisú reakciók).

A SAV-kezelést követően elért javulás alapvető mechanizmusa nem ismert, azonban az utóbbi évtizedekben végzett számos SAV-vizsgálatból több közös jellemző foglalható össze: 1) a kezelés időtartama alatt az összes IgE mennyisége nem változik, 2) az allergénspecifikus IgE mennyisége az adag emelésének időtartama alatt átmenetileg emelkedik, majd visszaesik a kezdeti (kezelés előtti) szintre, 3) az IgE epitópspecifikitása és affinitása változatlan marad, 4) a SAV-kezelés alatt

az allergénspecifikus IgG, elsősorban az IgG4 szintje meredeken emelkedik, 5) látszólag beindul egy új Th0/1-válasz és 6) a Th2-válasz változatlanul tűnik. Nincs összefüggés a SAV-kezeléssel indukált hatás és a specifikus IgG-válasz létrejötte között.

A SAV-kezelés új immunválaszt indukál, amely a kezelés alatt tovább érik [Th0/1 T-sejtek toborzódnak, allergénspecifikus IgX-válasz indul be (ahol X lehet A1, A2, G1, G2, G3, G4, M vagy D)]. Amint az új ellenanyag-válasz IgX affinitása (vagy mennyisége/affinitása) megéri, az IgX hatékonyan verseng az allergénért vagy allergénekért az IgE-molekulákkal, ezáltal gátolva a "normál", Th2-sejteken alapuló allergiás választ, amelyet receptorhoz kötött IgE-molekuláknak hízósejtek és bazofilsejtek felszínén történő kereszt-kapcsolódása jellemez. Ennek megfelelően, a klinikai tünetek fokozatosan enyhülnek.

A találmány azon a feltételezésen alapul, hogy ha a specifikus IgE mennyiségét versengő vegyületek (IgX és/vagy bármely interferáló anyag) jelenlétében, valamint azoktól mentesen meghatározzuk, felbecsülhetjük adott egyénben az immunválaszok kompetitív készségének a mértékét, és ez a mérték korrelál egy megfelelő hatás-paraméterrel.

A technika állása szerint ismert, az IgE "mennyiségi" meghatározására alkalmazott vizsgálatok többsége az IgE-szintet versengő vegyületek jelenléte nélkül méri. A találmány szerinti megoldás értelmében IgE mérését (szérumeredetű) versengő ágensek jelenlétében, valamint azoktól mentesen végezzük. Ennek megfelelően, az 1-6. igénypontokban definiált (vö.

a 2.a-c ábrákkal) eljárások az IgE-szinteket versengő ágensektől mentes körülmények között mérik, míg a 7-12. igénypontok szerinti, az (i'), (i), (i''), (y'), (y) és (y'') lépésekben definiált eljárás versengő ágensek jelenlétében mér IgE-szinteket.

Úgy gondoljuk, hogy a találmány szerinti eljárás működési módja az alábbiak szerint magyarázható: amennyiben a SAV-kezelés olyan választ indukál, amely verseng az IgE-molekulával az allergén megkötésében, lehetséges kell legyen a kezelés hatásának a mérése a fenti két eljárással meghatározott IgE-szintek összehasonlításával. Amennyiben a két eljárás azonos eredményt ad, nem indukálódott interferáló ágens, és a kezelésnek nincs hatása. Amennyiben az utóbbi eljárás szerinti mérés (versengő ágens jelenlétében) alacsonyabb értéket ad, mint az előbbi eljárás szerinti mérés (versengő ágensek nélkül), versengő választ váltottunk ki, és a kezelésnek van hatása.

A találmány egy másik változata szerint (7-12. igénypontok) az eljárás során két alvizsgálatot alkalmazunk, nevezetesen olyan alvizsgálatokat, amelyekben a mintában lévő ellenanyagot és az allergént más szérum-összetevők jelenléte nélkül [(h'), (h), (h''), (x'), (x), és (x'')] alvizsgálatok] vagy azok jelenlétében [(i'), (i), (i''), (y'), (y), és (y'')] alvizsgálatok] reagáltatjuk.

A (h) és (h'') alvizsgálatokban a kemilumineszcens jelölőanyag lehet akridinium-vegyület.

A (h'), (h), (h'') alvizsgálatok előnyös megvalósítási módjára jellemző, hogy az (a'), (a) vagy (a'') lépésekben az (i')

(i) és (i'') komponenseket egy műveletben elegyítjük (3.b ábra).

A (h'), (h) és (h'') alvizsgálatok első alternatív megvalósítási módjára jellemző, hogy az (a'), (a) vagy (a'') lépésekben az (i) és (ii) komponenseket egy műveletben elegyítjük, míg a (iii) komponenst egy második műveletben adjuk az elegyhez (3.c ábra).

A (h'), (h) és (h'') alvizsgálatok második alternatív megvalósítási módjára jellemző, hogy az (a'), (a) vagy (a'') lépésekben az (i) és (iii) komponenseket egy műveletben elegyítjük, míg a (ii) komponenst egy második műveletben adjuk az elegyhez (3.a ábra).

A találmány egy előnyös megvalósítási módjára jellemző, hogy az (ia'), (ia), (ia''), (ya'), (ya) vagy (ya'') lépéseket úgy végezzük, hogy elegyítjük az (i) és (ii) komponenseket, majd hozzáadjuk az (iii) komponenst, és legvégül adjuk az elegyhez (ha hozzáadjuk) a (iv) komponenst.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módjára jellemző, hogy az (ia'), (ia), (ia''), (ya'), (ya) vagy (ya'') lépéseket úgy végezzük, hogy elegyítjük az (i) (ii) és (iii) komponenseket, majd hozzáadjuk az (iv) komponenst (ha hozzáadjuk).

Ezenkívül egy további előnyös megvalósítási módra jellemző, hogy a (j'), (j), (j''), (z'), (z) vagy (z'') lépések szerinti összehasonlítást úgy végezzük, hogy kiszámítjuk a két lépés mérési eredményének az arányát. Más megoldás szerint, az összehasonlítást úgy is végezhetjük, hogy kiszámítjuk a két mérési eredmény közötti különbséget.

A találmány további megvalósítási módjára jellemző, hogy a (j') , (j) , (j'') , (z') , (z) vagy (z'') lépések szerinti összehasonlítást több időpontban végezzük a kezelés kezdetekor és időtartama alatt, és minden időszakos változást, amit tapasztalunk, a kezelés hatásának kiértékelése és előrejelzése alapjául alkalmazunk.

A találmány szerinti megoldás egy harmadik változata ugyanazon felismeréseken és feltételeken alapul, mint az előző, azzal a különbséggel, hogy nem korlátozódik egy specifikus immunvizsgáló eljárásra. Továbbá a vizsgálat alkalmazható bármely típusú, allergia elleni kezelés hatásának előrejelzésére.

A két kapott mérés összevetését úgy végezhetjük, hogy kiszámítjuk a két mérési eredmény arányát vagy a közöttük lévő különbséget.

Leírásunkban az "allergia-kezelés" alatt az allergia bármilyen kezelését értjük. Az "allergia-vakcinázás kezelés" alatt az allergia bármilyen, vakcinázással történő kezelését értjük. A "Specifikus Allergia-vakcina" kezelést (SAV) fentebb ismertettük.

A leírásban a "minta ellenanyaga" és a "minta ellenanyag" kifejezések alatt specifikus ellenanyagot, előnyösen az IgA, IgD, IgE, IgG és IgM osztályba és azok alosztályaiba tartozó specifikus immunglobulint érthetünk. Általánosságban, az ellenanyag lehet bármely vérszérum- vagy vérplazma-komponens, amely képes specifikusan interferálni az immunglobulinok, valamint antigén formában jelen lévő ligandum, egy másik ellenanyag vagy haptén, például enzimgátlók és receptorok közötti

kölcsönhatással. A "folyékony minta" kifejezés alatt bármely folyadékot, vagy folyékonnyá tett mintát értünk, beleértve oldatokat, emulziókat, diszperziókat és szuszpenziókat. A minta lehet biológiai folyadék, például vér, plazma, szérum, vizelet, nyál és bármely más nedv, amely exkretálódik, szekretálódik vagy szállítódik a biológiai szervezetben.

Az "antigén, ellenanyag vagy haptén formában jelen lévő ligandum" lehet bármely immunológiailag aktív ágens. "Antigén" lehet egy allergén, például fákról, fűvekről gyomokról származó pollen, penészszeredetű allergén, lehetnek atka- vagy más állat- például macska-, kutya-, ló-, szarvasmarha- és madáreredetű allergének, fullánkös rovarokból származó allergének, rovarokból származó belélegzett allergének, valamint élelmiszer allergének; "ellenanyag" lehet monoklonális és poliklonális ellenanyag, beleértve azok rekombináns és fragmentált formáit; és "haptén" lehet szénhidrát molekula-rész és azok fragmentumai, enzimgátlók vagy gyógyhatású készítmények, mint például penicillin és származékai.

A "jelölt ligandum" kifejezés alatt bármely, immunvizsgálatokban szokásosan alkalmazott jelölő rendszert értünk, beleértve lumineszcens, kemilumineszcens, enzim, radioaktív, fluoreszcens és abszorbanciás jelölőanyagokat.

A "hordozó" kifejezés alatt bármely szilárd tartófelületet értünk, amely immunvizsgálatban alkalmazható, például mikrotitráló lemez, részecske, cső vagy polimer anyagból előállított szivacs (mátrix) és hasonló.

A "szilárd részecske" kifejezés alatt bármely szemcsés anyagot értünk, amely folyadékban szuszpendálható, például

üveggyöngy, fém-, például vasrészecske, polimer anyagokból előállított részecskék és hasonlók.

A szilárd fázis elválasztása a folyadék fázistól megoldható - az alkalmazott szilárd részecske típusától függően - például mágneses elválasztással, filtrációval, ülepitéssel, centrifugálással, kromatográfiával vagy oszlopkromatográfiával.

A "szilárd paramágneses részecske" kifejezés alatt bármely paramágneses részecskét értünk, amely folyadék közegben diszpergálható vagy szuszpendálható, például "Biomag" részecskék (terminális aminosz csoportokkal bevont vasoxid-részecskék), amelyet az Advanced Magnetics Inc., USA forgalmaz, vagy "Dynabeads" részecskék (egy polimerrel bevont vasoxid-részecskék), amelyet a Dynal A.S., Norvégia forgalmaz.

A "reagálóképes ellenanyag" kifejezés alatt minden olyan ellenanyagot vagy más biospecifikus reagenst értünk, amely reagálni képes a minta-ellenanyaggal, beleértve monoklonális és poliklonális ellenanyagokat, valamint azok rekombináns és fragmentált változatait, például a MAb A 5697-1A3 (920325) azonosítású monoklonális ellenanyagot, amelyet a BioInvent International AB Svédország forgalmaz, a "protein A" vagy "protein G" reagenseket, amelyeket a Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA forgalmaz.

A kemilumineszcens vegyület előnyösen egy akridinium-vegyület lehet, például N-hidroxi-szukcinimid-dimetil-akridinium-észter (NHS-DMAE). Avidint vagy streptavidint a DMAE-reagenshez Weeks és munkatársai eljárása [Clinical Chem. 29, 1474-1479 (1983)] szerint kapcsolhatunk. Más, a találmány

gyakorlatba vétele során alkalmazható kemilumineszcens vegyület lehet a luminol, lucigenin vagy lofin.

Az alábbiakban részletesebben ismertetjük a találmány lényegét, tekintettel a csatolt ábrákra, ahol

az 1.a-b ábrák a WO 94/11734 számú nemzetközi közzétételi iratban ismertetett (a technika állása szerint ismert A. és B. eljárások), a technika állása szerint ismert eljárás két-féle megvalósítási módját mutatják diagramm formájában;

a 2.a-c ábrák három olyan előnyös vizsgálatot mutatnak diagramm formájában, amelyek alkalmazhatók a 7-9. igénypon-
tokban definiált eljárásokban;

a 3.a-c ábrák a találmány szerinti három előnyös vizsgálato-
tot mutatnak diagramm formájában;

a 4-6. ábrák a kemilumineszcencia szintjét mutatják a spe-
cifikus IgE koncentrációjának függvényében, a technika állása
szerint ismert B. eljárás alkalmazásával, valamint a talál-
mány szerinti 1. eljárás és a találmány szerinti 1. al-el-
járás alkalmazásával;

a 7. ábra a relatív kemilumineszcencia szintjét mutatja az
interferáló ellenanyagok mennyiségének függvényében, a tech-
nika állása szerint ismert B. eljárás alkalmazásával, vala-
mint a találmány szerinti 1. eljárás és a találmány szerinti
1. al-eljárás alkalmazásával;

a 8-12. ábrák kiszámolt kemilumineszcencia szintjét mutat-
ják a várt szinthez viszonyítva, a hígítás mértékének függvé-
nyében, a technika állása szerint ismert B. eljárás alkalma-
zásával, valamint a találmány szerinti 1. eljárás alkalmazá-
sával, SAV-kezelésnek kitett egyénekből származó négy mintá-

ból és egy referencia-szérumból (12. ábra);

a 13-14. ábrák SAV-kezelésnek és placebo kezelésnek kitett egyének relatív válaszát mutatják a 0., 6. és 12. hónapokban, a technika állása szerint ismert B. eljárás alkalmazásával, valamint a találmány szerinti 1. eljárás alkalmazásával;

a 15. ábra a technika állása szerint ismert B. eljárás alkalmazásával, valamint a találmány szerinti 1. eljárás alkalmazásával kapott válaszok arányát mutatja;

a 16-18. ábrák a relatív IgE-szinteket mutatják a 0., 6., 12. és 24. hónapokban, három klinikai csoportban, a hatást mutató, hatást nem mutató és a kétes hatást mutató csoportban;

a 19. ábra a találmány szerinti 1. eljárás alkalmazásával, valamint a technika állása szerint ismert B. eljárás alkalmazásával kapott válaszok arányát mutatja az idő függvényében, különböző SAV-kezelési dózisok mellett;

a 20. ábra a találmány szerinti 1. eljárás alkalmazásával, valamint a technika állása szerint ismert B. eljárás alkalmazásával kapott válaszok átlagának arányát mutatja az idő függvényében, klinikai hatást mutató, valamint klinikai hatást nem mutató egyéneken;

a 21. ábra a találmány szerinti 1. eljárás alkalmazásával, valamint a technika állása szerint ismert B. eljárás alkalmazásával kapott egyedi válaszok arányát mutatja az idő függvényében, klinikai hatást mutató egyéneken;

a 22. ábra a találmány szerinti 1. eljárás alkalmazásával, valamint a technika állása szerint ismert B. eljárás alkalmazásával kapott egyedi válaszok átlagának arányát mutatja az

idő függvényében, klinikai hatást nem mutató egyéneken.

Az 1.a ábra a WO 94/11734 számú nemzetközi közzétételi iratban ismertetett vizsgálat egyik megvalósítási módjának az elvét mutatja. Ebben a vizsgálatban a mintából (i) kimutatni kívánt ellenanyagot (specifikus IgE) elegyítik paramágneses részecskéhez kapcsolt reagáló ellenanyaggal (ii), hogy két-komponensű komplexet kapjanak, amelyet inkubálnak, majd biotinilált allergént (iii) adnak hozzá, hogy háromkomponensű komplexet kapjanak, amelyet inkubálnak, ezt követően egy avidinhez vagy streptavidinhez kapcsolt kemilumineszcens akridinium-vegyületet (iv) adnak hozzá, hogy négykomponensű komplexet kapjanak, amelyet mosnak, majd megméri a mosott komplex kemilumineszcens aktivitását.

Az 1.b ábra a technika állása szerint ismert eljárás egy másik megvalósítási módját mutatja, amely szerint az (i) és (iii) komponenseket elegyítik, hogy kétkomponensű komplexet kapjanak, és amely szerint a (ii) és (iv) komponenseket később adják hozzá, az így kapott elegyet inkubálják, hogy négykomponensű komplexet kapjanak, amelyet mosnak és kemilumineszcenciás mérésnek vetnek alá.

Az 1.a és 1.b ábrák szerinti vizsgálatokban a minta minden összetevője - beleértve az allergénre specifikus, keresztreaktáló, IgE és nem-IgE típusú ellenanyagokat - jelen van a négykomponensű komplex kialakulásához vezető, egymást követő reakciók során.

A 2.a ábra a találmány szerinti megoldás (2. igénypont) egyik előnyös megvalósítási módját mutatja, amely szerint az (i) és (ii) komponenseket elegyítjük és inkubáljuk, hogy két-

komponensű komplexet kapjunk, amelyet mosunk. Ezt követően, a (iii) komponenst hozzáadjuk, hogy háromkomponensű komplexet kapjunk, majd hozzáadjuk a (iv) komponenst, hogy négykomponensű komplexet kapjunk, amelyet mosunk és kemilumineszcenciás mérésnek vetünk alá.

A 2.b ábra a találmány szerinti megoldás egy további előnyös megvalósítási módját (5. igénypont) mutatja, amely megfelel a 2.a ábrán mutatott eljárásnak, kivéve, hogy a (iii) és (iv) komponenseket egy műveletben adjuk az elegyhez.

A 2.c ábra a találmány szerinti megoldás egy további előnyös megvalósítási módját (6. igénypont) mutatja, amely megfelel a 2.a ábrán mutatott eljárásnak, kivéve, hogy a képződött háromkomponensű komplexet mosásnak vetjük alá, mielőtt a (iv) komponenst hozzáadjuk.

A 2.a, 2.b és 2.c ábrákon bemutatott vizsgálatokban a minta összetevőit - beleértve az allergénre specifikus, kereszt-reagáló, IgE és nem-IgE típusú ellenanyagokat - eltávolítjuk a (ii) komponenssel történő reagálást követően, következésképpen azok hiányoznak a négykomponensű komplex kialakulásához vezető, egymást követő reakciók során.

A 3.a ábra a 7-9. igénypontok szerinti (h'), (h) és (h'') alvizsgálatok egyik előnyös megvalósítási módját mutatja, amely szerint az (i) és (iii) komponenseket egy első műveletben elegyítjük, hogy kétkomponensű komplexet kapjunk, amelyhez a (ii) komponenst egy második műveletben adjuk hozzá, a kapott elegyet inkubáljuk, hogy háromkomponensű komplexet kapjunk, amelyet mosunk, mielőtt hozzáadjuk a (iv) komponenst, hogy négykomponensű komplexet kapjunk, amelyet mosunk,

mielőtt kemilumineszcenciás mérésnek vetjük alá.

A 3.b ábra a 7-9. igénypontok szerinti (h'), (h) és (h'') alvizsgálatok egy további előnyös megvalósítási módját mutatja, amely szerint az (i), (ii) és (iii) komponenseket egy első műveletben elegyítjük, hogy háromkomponensű komplexet kapjunk, amelyet mosunk, mielőtt hozzáadjuk a (iv) komponenst, hogy négykomponensű komplexet kapjunk, amelyet mosunk, mielőtt kemilumineszcenciás mérésnek vetjük alá.

A 3.c ábra a 7-9. igénypontok szerinti (h'), (h) és (h'') alvizsgálatok egy további előnyös megvalósítási módját mutatja, amely szerint az (i) és (ii) komponenseket elegyítjük, hogy kétkomponensű komplexet kapjunk, amelyet mosunk, amelyhez hozzáadjuk a (iii) komponenst, hogy háromkomponensű komplexet kapjunk, amelyet mosunk, mielőtt hozzáadjuk a (iv) komponenst, hogy négykomponensű komplexet kapjunk, amelyet szintén mosunk, mielőtt kemilumineszcenciás mérésnek vetjük alá.

A 3.a, 3.b és 3.c ábrákon mutatott vizsgálatokban, a minta összetevőit - beleértve az allergénre specifikus, keresztreakáló, IgE és nem-IgE típusú ellenanyagokat - eltávolítjuk a (ii) és (iii) komponensekkel történő reagálást követően, következésképpen azok hiányoznak a négykomponensű komplex kialakulásához vezető reakció során.

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal szemléltetjük, a korlátozás szándéka nélkül.

Reagensok előállítása

Biotinilált *Dermatophagoides pteronyssinus* extraktum

Dermatophagoides pteronyssinus extraktumot (ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia) biotiniláltunk 30:1 molarányban.

Biotin-amidokaproát-N-hidroxi-szukcinimid-észtert (Biotin-XX-NHS, Clontech, USA) oldottunk dimetil-formamidban (Merck) 25 mg/ml végkoncentrációban. Ezen Biotin-XX-NHS oldat 55,4 µl-ét hozzáadtuk 0,1 mol/l NaHCO₃ (pH=8,5) pufferben oldott, 1 ml térfogatú, 2,44 mg/ml koncentrációjú *Dermatophagoides pteronyssinus* extraktumhoz. A reagenseket 25 percen át inkubáltuk 25 °C-on, egy billenős rázóberendezésen. A biotinilált extraktumot molekulatömeg-kizárásos kromatográfia eljárással tisztítottuk PD10-oszlopon (Pharmacia). Az allergéneket tartalmazó frakciót összegyűjtöttük. A boitinilált *Dermatophagoides pteronyssinus* extraktumot 0,1% humán szérumalbumint és 0,09% NaN₃ reagenst (Merck) tartalmazó foszfáttal pufferelt fiziológiás konyhasóoldatban (pH=7,2) hígítottuk.

Biotinilált *Alternaria alternata* extraktum

Alternaria alternata extraktumot (ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia) biotiniláltunk 30:1 molarányban. Biotin-amidokaproát-N-hidroxi-szukcinimid-észtert (Biotin-XX-NHS, Clontech, USA) oldottunk dimetil-formamidban (Merck) 25 mg/ml végkoncentrációban. Ezen Biotin-XX-NHS oldat 38,6 µl-ét hozzáadtuk 0,1 mol/l NaHCO₃ (pH=8,5) pufferben oldott, 1 ml térfogatú, 1,7 mg/ml koncentrációjú *Alternaria alternata* extraktumhoz. A reagenseket 25 percen át inkubáltuk 25 °C-on, egy billenős rázóberendezésen. A biotinilált extraktumot molekulatömeg-kizárásos kromatográfia eljárással tisztítottuk PD10-oszlopon (Pharmacia). Az allergéneket tartalmazó frakciót összegyűjtöttük. A biotinilált *Alternaria alternata* extraktumot 0,1% humán szérumalbumint és 0,09% NaN₃ reagenst (Merck) tartalmazó foszfáttal pufferelt fiziológiás konyhasóoldatban

(pH=7,2) hígítottuk.

Biotinilált *Betula verrucosa* (ezüst nyír) pollen-extraktum

Betula verrucosa pollen-extraktumot (ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia) biotiniláltunk 10:1 molarányban. Biotin-amidokaproát-N-hidroxi-szukcinimid-észtert (Biotin-XX-NHS, Clontech, USA) oldottunk dimetil-formamidban (Merck) 25 mg/ml végkoncentrációban. Ezen Biotin-XX-NHS oldat 33,5 µl-ét hozzáadtuk 0,1 mol/l NaHCO₃ (pH=8,5) pufferben oldott, 1 ml térfogatú, 4,4 mg/ml koncentrációjú *Betula verrucosa* extraktumhoz. A reagenseket 25 percen át inkubáltuk 25 °C-on, egy billenős rázóberendezésen. A biotinilált extraktumot molekulatömeg-kizárásos kromatográfia eljárással tisztítottuk PD10-oszlopon (Pharmacia). Az allergéneket tartalmazó frakciót összegyűjtöttük. A biotinilált *Betula verrucosa* extraktumot 0,1% humán szérumalbumint és 0,09% NaN₃ reagenst (Merck) tartalmazó foszfáttal pufferelt fiziológiás konyhasóoldatban (pH=7,2) hígítottuk.

Streptavidin-akridinium-észter jelölőanyag előállítása

Streptavidint (Boehringer Mannheim) konjugáltunk NSP-DMAE-NHS [2',6'-dimetil-4'-(N-szukcinimidiloxi-karbonil)-fenil-10-(3-szulfopropil)-akridinium-9-karboxilát] reagenssel, Weeks és munkatársai módosított eljárásával [lásd: Ian Weeks, Traj Beheshti, Frank McCapra, Anthony K. Campbell és J. Stuart Woodhead: *Clinical Chemistry*, 29, 1474-1479 (1983)].

Streptavidin-akridiniumészter jelölőanyag előállítása

(fénykibocsátó reagens)

NSP-DMAE-NHS (Chiron Diagnostics, MA, USA) reagenst oldottunk dimetil-formamidban (Merck) 1 mg/ml végkoncentrációban.

Ezen oldat 0,5 ml-ét hozzáadtuk 0,15 mol/l NaCl-t tartalmazó 0,1 mol/l nátrium-foszfát pufferben (pH=8,5) oldott, 1,7 ml térfogatnyi, 5,88 mg/ml koncentrációjú streptavidin reagenshez. A reagenseket 30 percen át inkubáltuk 25 °C-on, állandó keverés mellett. Az inkubálást követően az elegyhez 0,4 ml térfogatnyi, 20 mg/ml koncentrációjú 6-amino-hexánsavat adtunk. A szabad DMAE-reagens eltávolítása céljából az elegyet PD-10 oszlopra (Pharmacia, Uppsala, Svédország) vittük. A konjugált streptavidint foszfáttal pufferelt fiziológiás konyhasóoldattal (PBS, pH=7,2) eluáltuk és a konjugált streptavidint tartalmazó frakciót összegyűjtöttük. A konjugált streptavidint 0,1% HSA (Sigma) proteint, 0,1% Tween-20 reagenst (Merck) és 0,09% NaN₃ reagenst tartalmazó PBS-pufferben (pH=7,2) hígítottuk végső koncentrációra.

Ellenanyag immobilizálása paramágneses részecskékre

Paramágneses részecskéket (6,5 g) (Chiron Diagnostics, MA, USA) mostunk háromszor, 650 ml térfogatnyi, 0,01 mol/l koncentrációjú acetát-pufferben (pH=5,5), mágneses elválasztást alkalmazva. A részecskéket 6,25%-os glutáraldehid reagenssel (Merck) aktiváltuk 0,01 mol/l acetát-pufferben, 3 órán át, 25 °C-on. A részecskéket hatszor mostuk 650 ml acetát-pufferben (pH=5,5). A részecskéket 1625 mg, IgE Fc-doménra specifikus, IgE elleni monoklonális ellenanyaggal (BioInvent International AB, Svédország) kapcsoltuk. A részecskéket kétszer mostuk 650 ml, 0,01 mol/l foszfát-pufferben (pH=7,4). A főleg aktív csoportokat 0,01 mol/l foszfát-pufferben oldott, 1083 mg HSA (Sigma) hozzáadásával blokkoltuk 20 órán át 25 °C-on. A részecskéket 650 ml, 0,01 mol/l foszfát-pufferben

(pH=7,4) mostuk, ezt követően háromszor mostuk 650 ml, 1 mol/l NaCl (Merck) oldattal. A részecskéket háromszor mostuk 0,01 mol/l foszfát-pufferben (pH=7,4), majd 650 ml, 0,1% HSA-t (Sigma) tartalmazó PBS-pufferben (pH=7,4). A részecskéket 325 ml térfogatban reszuszpendáltuk és 50 °C-on hőkezeltük, 16 órán át. A részecskéket négyszer mostuk 650 ml, 0,1% HSA-t tartalmazó, 0.01 mol/l foszfát-pufferben (pH=7,4). A részecskéket 37 °C-on hőkezeltük 7 napon át, 650 ml, 0,1% HSA-t tartalmazó, 0,01 mol/l (pH=7,4) foszfát-pufferben, a puffert a 3. és 5. napon cseréltük. A részecskéket 0,1% HSA-t és 0,09% NaN_3 -reagenst tartalmazó, foszfáttal pufferelt fiziológiás konyhasóoldattal (PBS, pH=7,2) hígítottuk végső koncentrációra.

A vizsgálatoknál alkalmazott mosópuffer összetétele

A vizsgálatoknál alkalmazott mosópuffer 200 mmol/l kálium-foszfát puffert (pH=7,4), 100 mmol/l kálium-kloridot, 0,1% Tween 20 reagenst, és 0,09% NaN_3 -reagenst tartalmazott.

1. példa

Specifikus ellenanyag (specifikus IgE) meghatározása

A *Betula verrucosa* (ezüst nyír) allergénre specifikus IgE ellenanyag meghatározását három különböző eljárással végeztük, az ismertetett reagensek eljárásonként meghatározott munkahígításait alkalmazva. Az alkalmazott eljárások a technika állása szerint ismert B eljárás (1.b ábra), a találmány szerinti 1. eljárás (2.a ábra, 2. igénypont) és a találmány szerinti 1. al-beljárás (3.a ábra) voltak.

A technika állása szerint ismert B. eljárás

Ezt az eljárást egy *Ciba Corning ACS:180 Benchtop Immuno-

assay Analyzer" készüléken végeztük, amelyet J. Boland, G. Carey, E. Krodel és M. Kwiatkowski: Clinical Chemistry, 36, 1598-1602 (1990) irodalmi helyen ismertetnek. Az analizátort gyárilag egy 40 másodperc időciklusú szoftverrel szerelték fel, amely a szokásos inkubációs idők kétszeresét teszi lehetővé. A minta 50 µl-ét, és a *Betula verrucosa* allergén 1:5000 arányú hígításának 50 µl-ét mérjük a küvettába a minta-adagolóval. Amikor 12 perc inkubálás elteltével a küvette eléri az R2 reagens pontot, 100 µl, 1:20 arányban hígított paramágneses részecskét, valamint 1:10000 arányban hígított fénykibocsátó reagenst mérünk be egyidejűleg, majd a küvette továbbmozog a nyomvonalon. A mágneseket és a mosási állomást további 12 perc 40 másodperc inkubálás után éri el a küvette. Kétszer végzünk mosást 750 µl ionmentesített vízzel. A mosási ciklus befejeztével a paramágneses részecskéket 0,5 g/l H₂O₂ reagenst tartalmazó, 0,1 mol/l HNO₃ oldat 300 µl-ében újra-szuszpendáljuk. A küvette belép a luminométer-kamrába, és ekkor a fotomultiplikátor előtt 300 µl, 25 mmol/l NaOH oldatot mérünk a küvettába, mérjük és mennyiségileg meghatározzuk az emittált fény-fotonokat, és relatív fény-egységekben ("relative light units", RLU) fejezzük ki. Az RLU mennyisége arányos a mintában található IgE mennyiségével. A minta bemérése és az első eredmény között eltelt idő 30 perc, és minden 40 másodperc elteltével kapjuk a következő új eredményt. Az eredményeket a vizsgálati-RLU és a háttér-RLU hányadosaként fejeztük ki, ahol a háttér-RLU az IgE jelenléte nélkül végzett kemilumineszcens reakcióval kapott érték.

A találmány szerinti 1. eljárás

Ezt az eljárást szintén egy módosított "Ciba Corning ACS:180 Benchtop Immunoassay Analyzer" készüléken végeztük. A minta 25 µl-ét a küvettába mérjük a minta-adagolóval, majd közvetlenül ezután, 1:20 arányban hígított paramágneses részecskék 100 µl-ét adjuk hozzá egy rögzített adagolóval. Nyolc perc inkubálást követően, a paramágneses részecskéket mágneses úton elválasztjuk, és egyszer mossuk 1 ml mosópufferrel. A paramágneses részecskéket újraszuszpendáljuk a mosópuffer 100 µl-ében, majd 1:1500 arányban hígított, biotinilált *Betula verrucosa* allergén 50 µl-ét mérjük a küvettába. Tíz perc inkubálást követően, 1:5000 arányban hígított fénykibocsátó reagens 100 µl-ét mérjük be egy rögzített adagolóval, majd további 8 perc inkubálást követően, a paramágneses részecskéket mágneses úton elválasztjuk, és háromszor mossuk 1 ml mosópufferben. A mosási ciklus befejeztével, a paramágneses részecskéket 0,5 g/l H_2O_2 reagenst tartalmazó, 0,1 mol/l HNO_3 oldat 300 µl-ében újraszuszpendáljuk. A küvetta belép a luminométer-kamrába, és a fotomultiplikátor előtt 300 µl, 25 mmol/l NaOH oldatot mérünk be, mérjük és mennyiségileg meghatározzuk az emittált fény-fotonokat, és relatív fény-egységekben ("relative light units", RLU) fejezzük ki. Az RLU mennyisége arányos a mintában található IgE mennyiségével. Az eredményeket a vizsgálati-RLU és a háttér-RLU hányadosaként fejeztük ki, ahol a háttér-RLU az IgE jelenléte nélkül végzett kemilumineszcens reakcióval kapott érték.

1. al-eljárás

Ezt az eljárást manuálisan végeztük, 5 ml-es polisztirol kémcsövekben (Sarstedt). A minta 25 µl-ét elegyítettük 1:50 arányban hígított, biotinilált *Betula verrucosa* allergén 50 µl-ével. Tizenkét percen át, 37 °C-on történő inkubálást követően, 1:20 arányban hígított paramágneses részecskék 100 µl-ét adjuk az elegyhez, az elegyet 5 perc 30 másodpercen át, 37 °C-on inkubáljuk, majd a paramágneses részecskéket mágneses úton elválasztjuk, és egyszer mossuk 3 ml mosópufferben, "Magic Lite Multitube Washer" (ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia) berendezés alkalmazásával. A paramágneses részecskéket újraszuszpendáljuk 1:10000 arányban hígított fénykibocsátó reagens 200 µl-ében, 7 perc 30 másodpercen át inkubáljuk 37 °C-on, majd a paramágneses részecskéket mágneses úton elválasztjuk, kétszer mossuk 3 ml mosópufferben, "Magic Lite Multitube Washer" (ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia) berendezés alkalmazásával. A paramágneses részecskéket újraszuszpendáljuk 100 µl ionmentesített vízben és a kemilumineszcenciát "Magic Lite Analyzer II" (ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia) berendezéssel határozzuk meg úgy, hogy előbb 0,5 g/l H₂O₂ reagenst tartalmazó 0,1 mol/l HNO₃ oldat 300 µl-ét, majd 25 mmol/l NaOH oldat 300 µl-ét adjuk az elegyhez. Mérjük és mennyiségileg meghatározzuk az emittált fényfotonokat, és relatív fény-egységekben ("relative light units", RLU) fejezzük ki. Az RLU mennyisége arányos a mintában található IgE mennyiségével. Az eredményeket a vizsgálati-RLU és a háttér-RLU hányadosaként fejeztük ki, ahol a háttér-RLU az IgE jelenléte nélkül végzett kemilumineszcens re-

akcióval kapott érték.

- + - + - + -

Öt, nyírfa-pollenre érzékeny egyén kevert szérumából felező sorozathígítást készítünk, 140 SU/ml-től 1,1 SU/ml értékig, hogy 8 hígítást kapjunk. Ezt a 8 mintát vizsgáltuk együtt egy negatív mintával (háttér), továbbá 8, nyírfa-pollenre érzékeny egyén szérumát, a fent ismertetett három eljárással (lásd a 4., 5. és 6. ábrákat). Arra a következtésre jutottunk, hogy minden vizsgált minta, mindhárom eljárással vizsgálva, pozitívnak bizonyult.

2. példa

Interferencia más osztályba tartozó specifikus ellenanyagokkal (IgG)

Betula verrucosa (ezüst nyír) allergén elleni specifikus IgE szinteket határoztunk meg az 1. példában ismertetett három különböző eljárással, versengő specifikus ellenanyagok különböző mennyiségének a jelenlétében. Közelebbről: 5 nyírfa-pollenre érzékeny egyén kevert szérumát elegyítettük 1:5 arányban különböző titerű, nyúleredetű, poliklonális, *Betula verrucosa*-elleni ellenanyagot tartalmazó, IgE-negatív szérummal (ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia). A kontroll nem tartalmazott nyúleredetű ellenanyagot.

A 7. ábrán bemutatott eredményeket IgE-visszanyerés százalékában fejeztük ki, amely a mintába elegyített nyúleredetű ellenanyaggal kapott válasz kontroll értékhez viszonyított arányát képviseli. A válaszokat szignál/háttér értékben adtuk meg. A 100%-nál kisebb visszanyerés arra utal, hogy a versengő ellenanyag hozzáadása csökkenti a választ, míg a 100%-nál

nagyobb visszanyerés arra utal, hogy a versengő ellenanyag hozzáadása növeli a választ. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a találmány szerinti 1. eljárás kisebb mértékű interferenciát mutat a más osztályokba tartozó versengő ellenanyagokkal, mint a szimultán végzett eljárások. Míg versengő ellenanyagok hozzáadása jelentős pozitív interferenciát eredményez az 1. al-eljárás során, különösen nagymennyiségű interferáló ellenanyag jelenlétében, úgy tűnik, hogy az 1. eljárás során az interferencia teljesen kiküszöbölődött.

3. példa

Hígítási görbék készítése specifikus allergia-vakcinázás (SAV) kezelés alatt álló egyénekből származó mintákon

Alternaria alternata (penészgomba) allergén elleni specifikus IgE meghatározását a technika állása szerint ismert B. eljárással és az 1. példában ismertetett, találmány szerinti 1. eljárással végeztük, azzal a különbséggel, hogy biotínilált *Betula verrucosa* allergén helyett *Alternaria alternata* allergént alkalmaztunk. A biotínilált *Alternaria alternata* allergén munkahígítása mindkét eljárás során 1:400 volt.

Négy, SAV-kezelés alatt álló egyén szérumából felező sorozathígítást készítettünk, hogy négy mintát kapjunk, mielőtt azokat a két különböző eljárással megvizsgáltuk. Referenciaként 5 *Alternaria alternata* organizmusra érzékeny egyén elegyített szérumát vizsgáltuk. A 8-12. ábra bemutatja a négy SAV-kezelés alatt álló egyén mintája és a referencia-minta eredményeit. A 8-12. ábrán bemutatott eredmények a különböző mértékben hígított szérumokkal kapott válaszok, a várt válaszokhoz viszonyítva. A visszanyerés százalékos értékét a kö-

vetkező képlettel számoltuk: $(\text{hígítás foka}) \times (\text{megfigyelt válasz mértéke}) / (\text{tömény szérum válaszána mértéke})$. A válaszokat szignál/háttér értéken fejeztük ki. A 100%-nál kisebb visszanyerés arra utal, hogy a hígított szérumok válaszai alacsonyabbak a vártnál, míg a 100%-nál nagyobb visszanyerés arra utal, hogy a válaszok magasabbak a várt értékeknél. Ezért, a 100%-nál magasabb visszanyerés arra utal, hogy a hígítatlan mintával kapott válasz alulbecsüli a valóságos értéket.

A 8-12. ábrákból úgy tűnik, hogy a SAV-minták esetében a technika állása szerint ismert B. eljárás alulbecsüli a hígítatlan SAV-minták valódi értékeit, míg a találmány szerinti 1. eljárás korrektebb becslést eredményez. A SAV-kezelés alatt nem álló egyénekből származó, elegyített szérum esetében, mindkét eljárás kielégítően működik azáltal, hogy pontosabb értékeket ad.

Arra következtethetünk, hogy a két mosási lépést tartalmazó 1. eljárás sokkal megbízhatóbban becsüli fel a SAV-kezelés alatt álló egyének szérum-mintáiból az allergén-specifikus IgE mennyiségét, mint a technika állása szerint ismert B. eljárás.

4. példa

Az immunválasz követése házipor-atka allergén SAV-kezelés alatt

Dermatophagoides pteronyssinus (házipor-atka) allergén elleni specifikus IgE meghatározását a technika állása szerint ismert B. eljárással és az 1. példában ismerttetett, találmány szerinti 1. eljárással végeztük, azzal a különbséggel, hogy

biotinilált *Betula verrucosa* allergén helyett *Dermatophagoides pteronyssinus* allergént alkalmaztunk. A biotinilált *Dermatophagoides pteronyssinus* allergén munkahígítása mindkét eljárás során 1:250 volt.

Szérum mintákat vettünk klinikai vizsgálatba bevont egyénektől. Összesen 30 egyén kapott placebo kezelést ($n=14$) vagy SAV-kezelést *Dermatophagoides pteronyssinus* és *Dermatophagoides farinae* (Alutard, ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia) allergének 1:1 arányú elegyével ($N=16$). Mintát gyűjtöttünk a kezelést megelőzően ($t=0$), 6 hónapos kezelés után és 12 hónapos kezelés után ($t=12$), majd minden mintát két különböző eljárással vizsgáltuk. Az eredményeket az alábbiak szerint fejeztük ki: $(\text{szignál-háttér})/(\text{szignál}_{\text{magas}}\text{-háttér})$, ahol a $\text{szignál}_{\text{magas}}$ egy nagymennyiségű kimutatható specifikus ellenanyagot tartalmazó szérumelegy szignálja. Az eredményeket a 13-14. ábrán mutatjuk be. Egy további adatsort generáltunk azáltal, hogy kifejeztük a technika állása szerint ismert B. eljárás és a találmány szerinti 1. eljárással kapott eredmények egymáshoz viszonyított arányát. Ezeket az eredményeket a 15. ábra mutatja.

A fentiekből az alábbi következtetéseket vonhatjuk le. A szérumban jelen lévő specifikus IgE meghatározására alkalmazott egyik eljárás (a technika állása szerint ismert B. eljárás vagy az 1. eljárás) sem képes különbséget tenni az aktív és placebo-kezelt csoportok között a SAV-kezelés alatt (13-14. ábrák). Azonban, a technika állása szerint ismert B. eljárás szerint kapott eredmények és a találmány szerinti eljárással kapott eredmények egymáshoz viszonyított aránya

[arány=IgE (a technika állása szerint ismert B. eljárás-sal)/IgE (a találmány szerinti 1. eljárással)] meglepő módon különbséget tesz aktiv, és placebo-kezelt csoportok között a SAV-kezelés elkezdése után 6 és 12 hónap múlva (15. ábra). Valószínű továbbá, hogy egy körülbelül 1-nél meghúzott határ-érték jelzi, hogy adott egyén a placebo- vagy aktiv kezelt csoportba tartozik (17. ábra, $t=12$) azaz egy SAV-kezelés ha-tásfokát jelző paraméter.

A statisztikai vizsgálatokat nem-parametrikus tesztekkel végeztük (Mann-Whitney U-teszt). Minden 0,05-nél kisebb stochastikus valószínűséget szignifikánsnak tekintettünk. Az NS jelzés nem-szignifikáns különbségeket jelöl, amúgy az ak-tuális valószínűségi értékeket az ábrákon feltüntettük.

5. példa

Az immunválasz követése házipor-atka allergén SAV-kezelés alatt

Dermatophagooides pteronyssinus (házipor-atka) allergén el-
leni specifikus IgE ellenanyagok meghatározását két különböző
eljárással végeztük, a fent ismertetett reagenseket alkalmaz-
va, az egyes eljárásokra definiált munkahígításban. Az alkal-
mazott két eljárás a technika állása szerint ismert A. eljá-
rás (1. ábra) és a találmány szerinti 1. eljárás (2.a ábra,
2. számú igénypont) volt.

A technika állása szerint ismert A. eljárással

Ezt az eljárást egy módosított "Ciba Corning ACS:180
Benchtop Immunoassay Analyzer" készüléken végeztük. A minta
25 μ l-ét a kuvettába mértük a minta-adagolóval, majd közvet-
lenül ezután, 1:20 arányban hígított paramágneses részecskék

100 µl-ét adtuk hozzá egy rögzített adagolóval. Nyolc perc inkubálást követően, a paramágneses részecskéket mágneses úton elválasztottuk, és nem mostuk mosópufferrel. A paramágneses részecskéket újraszuszpendáltuk a mosópuffer 100 µl-ében, majd 1:250 arányban hígított, biotinilált *Dermaphagoides pteronyssinus* allergén 50 µl-ét mértük a küvettába. Tíz perc inkubálást követően, 1:5000 arányban hígított fénykibocsátó reagens 100 µl-ét mértük be egy rögzített adagolóval, majd további 8 perc inkubálást követően, a paramágneses részecskéket mágneses úton elválasztottuk, és háromszor mostuk 1 ml mosópufferben. A mosási ciklus befejeztével, a paramágneses részecskéket 0,5 g/l H_2O_2 reagenst tartalmazó, 0,1 mol/l HNO_3 oldat 300 µl-ében újraszuszpendáltuk. A küvettába - miután belépett a luminométer-kamrába és a fotomultiplikátor előtt - 300 µl, 25 mmol/l NaOH oldatot mértünk be, majd mértük és mennyiségileg meghatároztuk az emittált fény-fotonokat, és azokat relatív fény-egységekben ("relative light units", RLU) fejeztük ki. Az RLU mennyisége arányos a mintában található IgE mennyiségével. Az eredményeket a vizsgálati-RLU és a háttér-RLU hányadosaként fejeztük ki, ahol a háttér-RLU az IgE jelenléte nélkül végzett kemilumineszcens reakcióval kapott érték.

A találmány szerinti 1. eljárás

Ezt az eljárást egy módosított "Ciba Corning ACS:180 Benchtop Immunoassay Analyzer" készüléken végeztük. A minta 25 µl-ét a küvettába mértük a minta-adagolóval, majd közvetlenül ezután, 1:20 arányban hígított paramágneses részecskék 100 µl-ét adtuk hozzá egy rögzített adagolóval. Nyolc perc

inkubálást követően, a paramágneses részecskéket mágneses úton elválasztottuk, és egyszer mostuk 1 ml mosópufferrel.

A paramágneses részecskéket újraszuszpendáltuk a mosópuffer 100 μ l-ében, majd 1:250 arányban hígított, biotinilált *Dermatophagoides pteronyssinus* allergén 50 μ l-ét mértük a küvettába. Tíz perc inkubálást követően, 1:5000 arányban hígított fénykibocsátó reagens 100 μ l-ét mértük be egy rögzített adagolóval, majd további 8 perc inkubálást követően, a paramágneses részecskéket mágneses úton elválasztottuk, és háromszor mostuk 1 ml mosópufferben. A mosási ciklus befejeztével, a paramágneses részecskéket 0,5 g/l H_2O_2 reagenst tartalmazó, 0,1 mol/l HNO_3 oldat 300 μ l-ében újraszuszpendáltuk. A küvettába - miután belép a luminométer-kamrába és a fotomultiplikátor előtt - 300 μ l, 25 mmol/l NaOH oldatot mértünk be, majd mértük és mennyiségileg meghatároztuk az emittált fény-fotonokat, és relatív fény-egységekben ("relative light units", RLU) fejeztük ki. Az RLU mennyisége arányos a mintában található IgE mennyiségével. Az eredményeket a vizsgálati-RLU és a háttér-RLU hányadosaként fejeztük ki, ahol a háttér-RLU az IgE jelenléte nélkül végzett kemilumineszcens reakcióval kapott érték.

Ebbe a vizsgálatba összesen 28 egyént vontunk be. Tizenhárom egyén nem kapott semmilyen kezelést, 7 egyén 100-as szintű kezelést, 8 egyén pedig 300-as szintű SAV-kezelést kapott. A SAV-kezelés során az egyéneknek *Dermatophagoides pteronyssinus* (házipor-atka) allergént adtunk be szubkután injekciók formájában, kezdetben egy 21 hétig tartó, emelkedő dózisú periódusban hetenként, majd ezt követően egy kétéves

periódus alatt, 100 vagy 300 SQ-egység dózisokat minden 6-8. héten.

A vizsgálat során hatás-paramétert alkalmaztunk, amelyet bőrszúrás-tesztre ("skin prick test", SPT) és bronchiális provokálás tesztre (BPT) alapoztunk. Az alkalmazott klinikai hatás-paramétert az alábbiak szerint kaptuk: a relatív bőrin-dexeket $[SI(idő=x)-(idő=0)]$ alkalmaztuk az egyének két csoportba sorolásához (hatás = bőrszenzitivitás csökkenése, nincs hatás = változatlan bőrérzékenység). Hasonlóképpen, a relatív provokálási tesztet $[\log BPT(idő=x)-\log BPT(idő=0)]$ alkalmaztuk az egyének két csoportba sorolásához (hatás = csökkent bronchiális szenzitivitás, nincs hatás = változatlan bronchiális szenzitivitás). A két mértéket egyetlen klinikai hatás-paraméterre kombináltuk: klinikai hatás = hatás mindkét mértékben, nincs klinikai hatás = egyik mértékben sincs klinikai hatás, valamint kétes klinikai hatás = hatás az egyik mértékben, nincs hatás a másik mértékben.

A 16-18. ábrák mutatják a relatív IgE-szinteket a 0. (LT-S0-0), 6. (LT-S6-0), 12. (LT-S12-0) és 24. (LT-S24-0) hónapokban a három, klinikai hatás szerint felosztott csoportban (Hatás, Nincs hatás és a Kétes hatás). Az idő=0 a kezelést megelőző érték. A görbéken az nn-iii formátumú jelölés az egyén azonosítási számát (nn) és a kezelés típusát (iii) jelöli, ahol az iii=0 nem jelent kezelést, az iii=100 a 100-as szintű kezelést, az iii=300 pedig a 300-as szintű kezelést jelenti. A 0,14 értéknél meghúzott vonal önkényes határvonal. A relatív IgE-szintet az alábbiak szerint definiáltuk:

$$\log[\text{Válasz}(1. \text{ eljárás})/\text{Válasz}(\text{ismert A. eljárás})]_{t=x} - \\ \log[\text{Válasz}(1. \text{ Eljárás})/\text{Válasz}(\text{ismert A. Eljárás})]_{t=0},$$

ahol t = idő, x = 0, 6, 12, vagy 24 hónap, és válasz = szignál/háttér.

Amint az a 16. ábrán látható, az 1. eljárással mért válasz magasabb, mint a technika állása szerint ismert A. eljárással mért válasz, minden olyan egyén esetében, aki klinikai hatást mutatott, ami azt jelenti, hogy egy nem-IgE típusú, az allergénnel hatékonyan reagáló, versengő ellenanyagválasz indukálódott. A 17. ábra alapján úgy tűnik, hogy a klinikai hatást nem mutató csoportba tartozó egyetlen egyén sem fejlesztett ki versengő ellenanyagválaszt. Végül, a 18. ábra szerint úgy tűnik, hogy a klinikailag kétes csoportba tartozó egyetlen egyén fejlesztett ki pozitív versengő ellenanyagválaszt, amely csak bőrszűrős-teszttel volt kimutatható. A vizsgálat különbséget tesz a kezelt és kezeletlen egyének között, mivel a kontroll csoportból (nn-0) egyetlen egyént sem ítéltünk úgy, hogy versengő ellenanyagválaszt termelt.

A szérummintában található versengő anyagok jelenlétében vagy azok nélkül mért IgE aránya, azaz az 1. eljárással, valamint a technika állása szerint ismert A. eljárással mérve, előre jelzi SAV-kezelés hatását. Továbbá, az *in vitro* mért hatás korán megfigyelhető a kezelési rend során. Valószínű azonban, hogy a versengő ágens nem-IgE ellenanyag - bármely, az allergénnel specifikusan reagáló szérumösszetevőtől hasonló viselkedés várható el.

6. példa

Biotinilált Der p

A Der p 1 csak egy lizil-csoportot és az N-terminális aminosavat tartalmazza, amelyek biotinilálás céljából hozzáférhetők. Ha nyers Der p extraktumot biotinilálunk "szokásos" jelölő reagensek alkalmazásával (ezek NH_2 -csoportokat céloznak meg), az így kapott jelölt Der p extraktum hajlamos kereszt-érzékenységre a Der p 2 allergénnel és más allergénekkkel.

Egy jobban kiegyensúlyozott Der p reagenst állítottunk elő az alábbiak szerint: nyers Der p extraktumot biotiniláltunk ismert eljárással, majd olyan biotinilált Der p 1 készítményt adtunk hozzá, amelyet tirozin- és hisztidincsoportokat derivatizálni képes biotin-reagensek alkalmazásával jelöltünk. Az így előállított elegyet alkalmaztuk az alábbi vizsgálatokban.

Der p 1 biotinilálása

Der p 1 allergént (ALK-ABELLÓ A/S, Horsholm, Dánia) biotiniláltunk p-diazobenzóil-Biocytin reagenssel, amelyet a stabil p-aminobenzóil-Biocytin (Pierce, USA) prekursorból állítottunk elő a gyártó előírása szerint. Az előállított p-diazobenzóil-Biocytin elméleti koncentrációja 1,82 mg/ml volt (ez 3,38 mmol/l-nek felel meg), az p-aminobenzóil-Biocytin reagens p-diazobenzóil-Biocytin reagenssé való alakulásának hatékonyságát 100%-nak feltételezve. A Der p 1 allergént 17:1 molarányban biotiniláltuk, az allergén molekulatömegét 25 kD-nak feltételezve, 343 μl p-diazobenzóil-Biocytin reagenst adva 1 ml, 1,74 mg/ml Der p 1 reagenshez, 0,1 mol/l NaHCO_3 oldatban (pH=8,5). A folyamat következő lépései azonosak voltak

a Biotin-XX-NHS észterrel történő biotinilálással.

A mintákat ADVIA Centaur (Bayer Diagnostics) analizátorral vizsgáltuk. Az egyes mintákban mérhető, Der p allergénre specifikus IgE-mennyiséget két eljárás alkalmazásával határoztuk meg: egy kétlépéses eljárással (T), amely olyan mosási folyamatokat tartalmaz, amelyek eltávolítják az interferáló ágenseket (azaz nem-IgE típusú ellenanyagokat), mielőtt a biotinilált allergéneket hozzáadjuk az elegyhez, valamint egy egyidejűleg végzett eljárással, amely lehetővé teszi az interferáló ágensek (azaz nem-IgE típusú ellenanyagok) jelenlétét, amikor a biotinilált allergéneket bemérjük. A T és az S eljárások megfelelnek az 5. példában ismertetett 1. eljárásnak, és a technika állása szerint ismert A. eljárásnak, kivéve, hogy az allergént a fentiek szerint biotiniláltuk.

Biotinilált allergén-reagenst úgy állítottunk elő, hogy a biotinilált Der p 1 allergént 1:250 arányban hígítottuk, és ebből a reagensből 1 részt elegyítettünk 4 rész szokásos Der p reagenssel, amelyet a fent ismertetettek szerint állítottunk elő.

Negyvennyolc (N=48), SAV-kezelés alatt álló, Der p allergiás egyéntől vettünk szérummintákat a SAV-kezelés megkezdését követő 0., 0,5., 1., 2., 3., 6., 9., 12., 18., és 24. hónapban. Az egyéneket négy kezelési csoportba osztottuk: kontroll csoport (N=15), 10-es dózis (N=12), 100-as dózis (N=9) és 300-as dózis csoport (N=11). A csoportokat a megadott dózisú Der p Alutard vakcinával kezeltük 24 hónapon át.

Az SPT ("Skin Prick Test", bőrszúrás-teszt), BPT ("Bronchial Provocation Test", bronchiális provokációs teszt)

és a CPT ("Conjunctival Provocation Test", kötőhártya provokációs teszt) klinikai paramétereket mértük a SAV előtt, alatt és után, és a hatásosság mértékét a csoportokban vizsgált klinikai paraméterek alapján állítottuk fel. A SAV-kezelést abban az esetben ítéltük hatásosnak, ha két vagy három paraméter pozitív lett, hatástalannak pedig akkor, ha egy, vagy egy paraméter sem bizonyult pozitívnak.

Az IgE-szinteket a két eljárás szerint (T és S) határoztuk meg, és egy, az alapvonalhoz korrigált *in vitro* hatásossági paramétert az alábbi képlet szerint számoltuk ki: $LN(T_i/S_i) - LN(T_0/S_0)$, ahol i az időt ($>0 \leq 24$), a 0 pedig a kezelés előtti értékeket jelentí.

Nyilvánvaló dóziszfüggő válasz összefüggést tapasztaltunk az $LN(T_i/S_i) - LN(T_0/S_0)$ érték és a beadott dózis között (19. ábra; A hatásparaméter dóziszfüggő válasz összefüggése), ami arra utal, hogy ez a paraméter az egyénekben dózistól függő immunológiai változást mér. A 20. ábra (Hatásparaméter átlagok) mutatja a klinikai hatást mutató és nem mutató egyének esetében kapott *in vitro* hatásparaméter középértékeket, míg az egyedi hatásparaméter értékeket a 21. ábra (Hatás: egyedi értékek) és a 22. ábra (Nincs hatás: egyedi értékek) mutatja. Minden pozitív klinikai reakcióval rendelkező egyén *in vitro* paraméter érték növekedést mutat a kontroll csoporthoz viszonyítva a 6-24. hónapokban, és ezen egyének mindegyike aktív Der p SAV-kezelést kapott. Négy (14%), szemmel látható klinikai hatást nem mutató egyén esetében az *in vitro* hatásparaméter alapján úgy ítéltük meg, hogy lett hatás.

Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az *in vitro* hatás-

paraméter összefügg az egyén klinikai állapotával, és az in vitro paraméter előre jelzi a SAV-kezelés kimenetelét 6 hónap kezelés után, míg a klinikai hatások szokásosan csak 12-24 hónap kezelés után szembetűnőek.



Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás specifikus allergia-vakcinázás hatásának kiértékelésére és/vagy megjósolására, *azzal jellemezve*, hogy

(h') egy folyadékmintában meghatározzuk az antitest-tartalmat a következő vizsgálattal:

(a') keveréket készítünk egy folyadékfázisból és egy háromkomponensű, szilárdfázisú komplexből, amely a következő komponenseket tartalmazza: (i) a minta-antitest, (ii) szilárd részecskéken rögzített reagens-antitest, amely a minta-antitest ellen irányul és (iii) ligandum, amely lehet antigén, antitest vagy haptén,

(b') a háromkomponensű, szilárdfázisú komplexet elválasztjuk a folyadékfázistól,

(c') az elválasztott háromkomponensű, szilárdfázisú komplexről mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

(d') a háromkomponensű, szilárdfázisú komplexhez egy (iv) jelölővegyületet adunk, így egy négykomponensű komplexet kapunk,

(e') a négykomponensű, szilárdfázisú komplexet elválasztjuk az oldattól,

(f') az elválasztott négykomponensű, szilárdfázisú komplexről mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött (iv) vegyületet,

(g') a mosott, jelölőanyaggal ellátott, négykomponensű komplexen detektálási/mérési műveletet hajtunk végre,

(i') meghatározzuk az antitesttartalmat a következő vizsgálattal:

(ia') keveréket készítünk egy folyadékfázisból és egy négykomponensű, szilárdfázisú komplexből, amely a következő komponenseket tartalmazza: (i) a minta-antitest, (ii) szilárd részecskéken rögzített reagens-antitest, amely a minta-antitest ellen irányul, (iii) ligandum, amely lehet antigén, antitest vagy haptén és (iv) jelölővegyület,

(ib') a négykomponensű, szilárdfázisú komplexet elválasztjuk a folyadékfázistól,

(ic') az elválasztott négykomponensű, szilárdfázisú komplexről mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

(id') a mosott, jelölőanyaggal ellátott, négykomponensű komplexen detektálási/mérési műveletet hajtunk végre,

(j') összehasonlítjuk a (h') és (i') lépésben kapott eredményeket, és az összehasonlítás alapján kiértékeljük és/vagy megjósoljuk a specifikus allergia-vakcinázás hatását.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy

az (a') lépésben és az (ia') lépésben a ligandum biotinhoz vagy annak funkcionális származékához van kötve, és

a (d') lépésben és az (ia') lépésben a jelölővegyület kemilumineszcens vegyület, amely kovalensen avidinhez, streptavidinhez vagy ezek funkcionális származékához van kötve, és

a (g') lépésben és az (id') lépésben a detektálási/mérési művelet úgy hajtjuk végre, hogy a mosott, négykomponensű, szilárdfázisú komplexen iniciáljuk a kemilumineszcens reakciót, és detektáljuk/mérjük a kemilumineszcenciát.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy

az (a') lépésben és az (ia') lépésben a szilárd részecske szilárd paramágneses részecske, és



a (b'') lépésben és az (ib'') lépésben a szilárdfázisú komplex elválasztását a folyadékfázistól mágneses úton hajtjuk végre. 4. Eljárás specifikus allergia-vakcinázás hatásának kiértékelésére és/vagy megjósolására, *azzal jellemezve, hogy*

(x') egy folyadékmintában meghatározzuk az antitest-tartalmat a következő vizsgálattal:

(o') keveréket készítünk egy folyadékfázisból és egy kétkomponensű, szilárdfázisú komplexből, amely a következő komponenseket tartalmazza: (i) a minta-antitest és (ii) szilárd részecskéken rögzített reagens-antitest, amely a minta-antitest ellen irányul,

(p') a kétkomponensű, szilárdfázisú komplexet elválasztjuk a folyadékfázistól,

(q') az elválasztott kétkomponensű, szilárdfázisú komplexről mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

(r') a mosással tisztított, kétkomponensű, szilárdfázisú komplexhez egy (iii) ligandum oldatát adjuk, amely lehet antigén, antitest vagy haptén, és amely adott esetben jelölőanyaggal lehet ellátva, így egy háromkomponensű komplexet kapunk,

(s') a háromkomponensű, szilárdfázisú komplexhez adott esetben (iv) egy jelölővegyület oldatát adjuk, így négykomponensű, szilárdfázisú komplexet kapunk,

(t') az (r') vagy az (s') lépésben kapott három- vagy négykomponensű, szilárdfázisú komplexet elválasztjuk az oldattól,

(u') az elválasztott három- vagy négykomponensű, szilárdfázisú komplexről mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött (iv) vegyületeket,

(v') a mosott, jelölőanyaggal ellátott, három- vagy négykomponensű komplexen detektálási/mérési műveletet hajtunk végre,

(y') meghatározzuk az antitesttartalmat a következő vizsgálattal:

(ya') keveréket készítünk egy folyadékfázisból és egy háromkomponensű, szilárdfázisú komplexből, amely a következő komponenseket tartalmazza: (i) a minta-antitest, (ii) szilárd részecskéken rögzített reagens-antitest, amely a minta-antitest ellen irányul, (iii) ligandum, amely lehet antigén, antitest vagy haptén, amely egy (iv) jelölővegyülettel van jelölve vagy ahhoz van kötve, így egy többkomponensű, szilárdfázisú komplexet kapunk,

(yb') a többkomponensű, szilárdfázisú komplexet elválasztjuk a folyadékfázistól,

(yc') az elválasztott többkomponensű, szilárdfázisú komplexről mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

(yd') a mosott, jelölőanyaggal ellátott, többkomponensű komplexen detektálási/mérési műveletet hajtunk végre,

(z') összehasonlítjuk az (x') és (y') lépésben kapott eredményeket, és az összehasonlítás alapján kiértékeljük és/vagy megjósoljuk a specifikus allergia-vakcinázás hatását.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy*

az (r) lépésben és az (ya') lépésben a ligandum biotinhoz vagy annak funkciós származékához van kötve, és

az (s') lépés kötelező, és az (s'') lépésben és az (ya') lépésben a jelölővegyület avidinhez, streptavidinhez vagy ezek funkciós származékához kovalensen kötött kemilumineszcens vegyület, és

a (v') lépésben és az (yd') lépésben a detektálási/mérési művelet úgy hajtjuk végre, hogy a mosással tisztí-



tott, négykomponensű, szilárdfázisú komplexen iniciáljuk a kemilumineszcenciás reakciót, és detektáljuk/mérjük a kemilumineszcenciát.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (o') lépésben és az (ya') lépésben a szilárd részecske szilárd paramágneses részecske, és a (p') lépésben, a (t') lépésben és az (yb') lépésben a szilárdfázisú komplex elválasztását a folyadékfázistól mágneses úton hajtjuk végre.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (ia') és (ya') lépéseket úgy hajtjuk végre, hogy először keverjük az (i) és (ii) komponenseket, majd hozzáadjuk az (iii) komponenst és végül adott esetben az (iv) komponenst.

8. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (ia') és (ya') lépéseket úgy hajtjuk végre, hogy először keverjük az (i), (ii) és (iii) komponenseket, majd adott esetben hozzáadjuk az (iv) komponenst.

9. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a (j') és (z') lépéseket úgy hajtjuk végre, hogy számoljuk a két lépésben kapott mérési eredmények arányát.

10. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a (j') és (z') lépéseket a kezelés kezdetén és a kezelés során több alkalommal végrehajtjuk, és az észlelhető időleges változásokat alkalmazzuk a kezelés hatásának kiértékelése és/vagy megíósolása alapjaként.

11. Eljárás egy allergiás egyén immunológiai állapotának kiértékelésére, *azzal jellemezve*, hogy

A) az egyéntől származó folyadékmintában meghatározzuk az antitesttartalmat a következő (A) immunvizsgálattal: Aa) összekeverünk (i) egy minta-antitestet, (ii) egy, a minta-antitest Fc régiója ellen irányuló reagens-antitestet, amely szilárd hordozóhoz van rögzítve, és (iii) egy, a minta-antitest FAB régiója ellen irányuló ligandumot, amely lehet antigén, antitest vagy haptén, így egy háromkomponensű szilárdfázisú komplexet és egy folyadékfázist tartalmazó keveréket kapunk,

Ab) a háromkomponensű komplexet egy (iv) jelölővegyülettel érintkeztetjük, így egy négykomponensű komplexet és egy folyadékfázist tartalmazó keveréket kapunk,

Ac) a négykomponensű szilárd fázisról mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

Ad) a mosással tisztított, négykomponensű komplexen detektálást/mérést hajtunk végre, így egy A mérési eredményt kapunk,

B) meghatározzuk az antitesttartalmat a mintában a következő (B) vizsgálattal:

Ba) összekeverünk (i) egy minta-antitestet és (ii) egy, a minta-antitest Fc régiója ellen irányuló reagens-antitestet, amely szilárd hordozóhoz van rögzítve, így egy kétkomponensű szilárdfázisú komplexet és egy folyadékfázist tartalmazó keveréket kapunk,

Bb) a kétkomponensű szilárd fázisról mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

Bc) a mosással tisztított kétkomponensű szilárdfázisú komplexet érintkeztetjük (iii) egy, a minta-antitest Fab régiójához kötött ligandummal, amely lehet antigén, antitest vagy haptén, és egy (iv) jelölővegyülettel, így egy négykomponensű szilárdfázisú komplexet és egy folyadékfázist tartalmazó keveréket kapunk,

Bd) a négykomponensű szilárd fázisról mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

Be) a mosással tisztított, négykomponensű komplexen detektálást/mérést hajtunk végre, így egy B mérési eredményt kapunk,

E) kifejezzük az A és B mérési eredmény közötti interferenciaértéket, amelyet az egyén immunológiai ál-

lapota kiértékelésének paramétereiként alkalmazunk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az Ab) lépést úgy hajtjuk végre, hogy a (iv) jelölővegyületet az Aa) lépésben kapott háromkomponensű szilárdfázisú komplexet és folyadékfázist tartalmazó keverékhez adjuk.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az Ab) lépést úgy hajtjuk végre, hogy az Aa) lépésben kapott háromkomponensű komplexről mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket, majd a mosással tisztított háromkomponensű komplexhez hozzáadjuk a (iv) jelölővegyületet.

14. A 11-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Bc) lépést úgy hajtjuk végre, hogy az (iii) ligandumot és az (iv) jelölővegyületet együtt inkubáljuk a kétkomponensű komplexszel.

15. A 11-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy először a kétkomponensű komplexhez adagoljuk az (iii) ligandumot, így háromkomponensű komplexet kapunk, amelyről aztán mosással eltávolítjuk a komplexbe nem kötött (iii) ligandumot, majd adagoljuk az (iv) jelölővegyületet, így négykomponensű komplexet kapunk.

16. A 11-15. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy jelölővegyületként lumineszcens vegyületet, kemilumineszcens vegyületet, enzim jelzőanyagot, radioaktív jelzőanyagot, fluoreszcens jelzőanyagot vagy abszorbanancia jelzőanyagot alkalmazunk.

17. A 11-16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy biotinilált (iii) ligandumot alkalmazunk.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (iv) jelzővegyületként avidinhoz, streptavidinhez vagy ezek funkcionális származékához kovalensen kötött kemilumineszcens vegyületet alkalmazunk.

19. Eljárás egy allergiás egyén immunológiai állapotának kiértékelésére, *azzal jellemezve*, hogy

C) az egyéntől származó folyadékmintában meghatározzuk az antitesttartalmat a következő (C) immunvizsgálattal:

Ca) összekeverünk (i) egy minta-antitestet, (ii) egy, a minta-antitest Fc régiója ellen irányuló reagens-antitestet, amely szilárd hordozóhoz van rögzítve, és (iii) egy, a minta-antitest Fab régiója ellen irányuló, jelöléssel ellátott ligandumot, amely lehet antigén, antitest vagy haptén, így egy háromkomponensű szilárdfázisú komplexet és egy folyadékfázist tartalmazó keveréket kapunk,

Cb) a háromkomponensű szilárd fázisról mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

Cc) a mosással tisztított, jelöléssel ellátott, háromkomponensű komplexen detektálást/mérést hajtunk végre, így egy C mérési eredményt kapunk,

D) meghatározzuk az antitesttartalmat a mintában a következő (D) vizsgálattal:

Da) összekeverünk (i) egy minta-antitestet és (ii) egy, a minta-antitest Fc régiója ellen irányuló reagens-antitestet, amely szilárd hordozóhoz van rögzítve, így egy kétkomponensű szilárdfázisú komplexet és egy folyadékfázist tartalmazó keveréket kapunk,

Db) a kétkomponensű szilárd fázisról mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

Dc) a mosással tisztított kétkomponensű szilárdfázisú komplexet érintkeztetjük (iii) egy, a minta-antitest Fab régiójához kötött ligandummal, amely lehet antigén, antitest vagy haptén, így egy háromkomponensű szilárdfázisú komplexet és egy folyadékfázist tartalmazó keveréket kapunk,

Dd) a háromkomponensű szilárd fázisról mosással eltávolítjuk a komplexben nem kötött vegyületeket,

De) a mosással tisztított, háromkomponensű komplexen detektálást/mérést hajtunk végre, így egy D mérési eredményt kapunk,

E) kifejezzük a C és D mérési eredmény közötti interferenciaértéket, amelyet az egyén immunológiai állapota kiértékelésének paramétereként alkalmazunk.

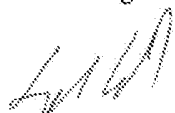
20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy radioaktív atommal jelölt ligandumot alkalmazunk.

21. A 11-20. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy allergiakezelés, allergia-vakcinázás vagy specifikus allergia-vakcinázás (SAV) alatt álló egyén állapotát értékeljük ki.

A meghatalmazott:

DANUBIA

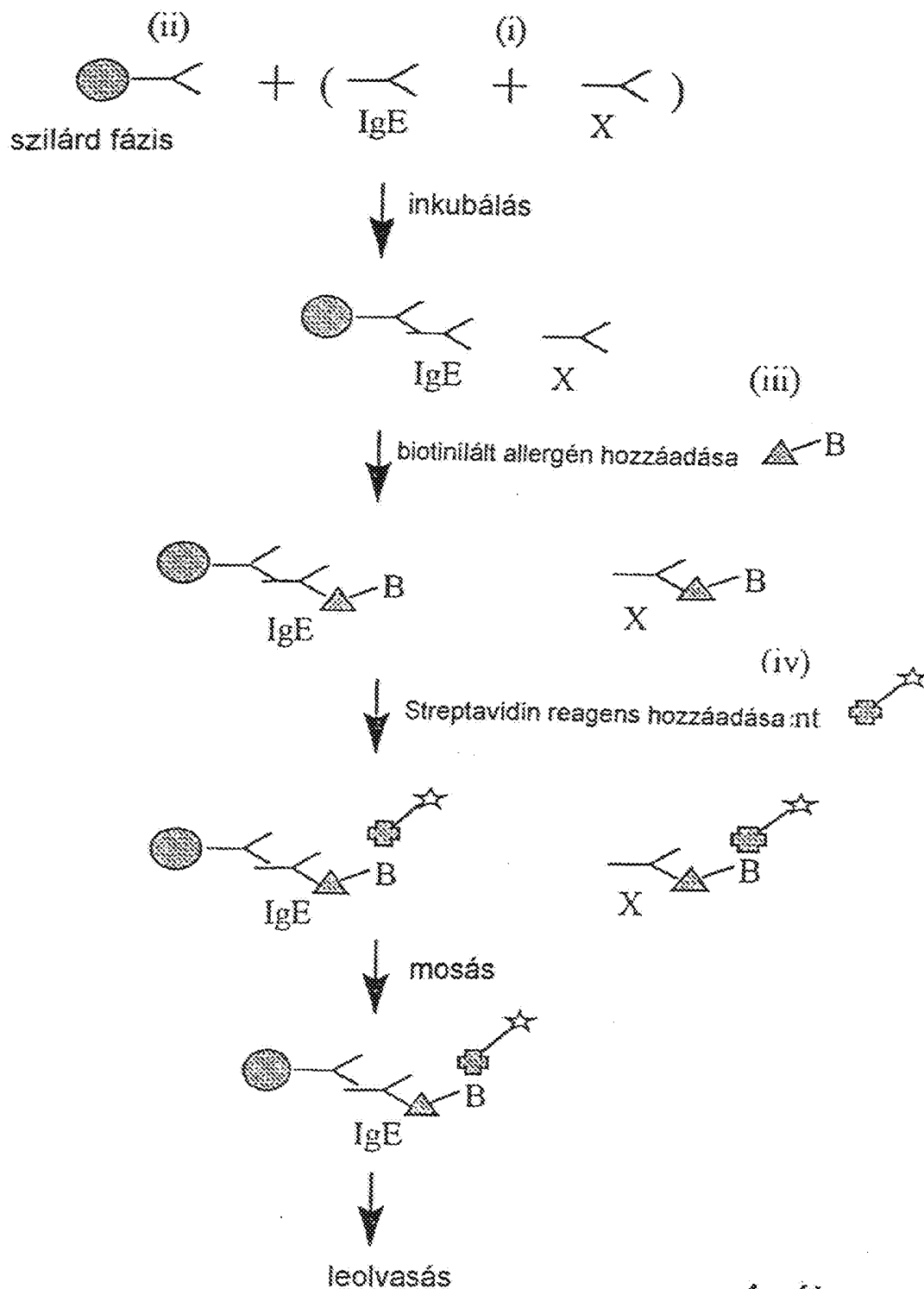
Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.



Lengyel Zsolt

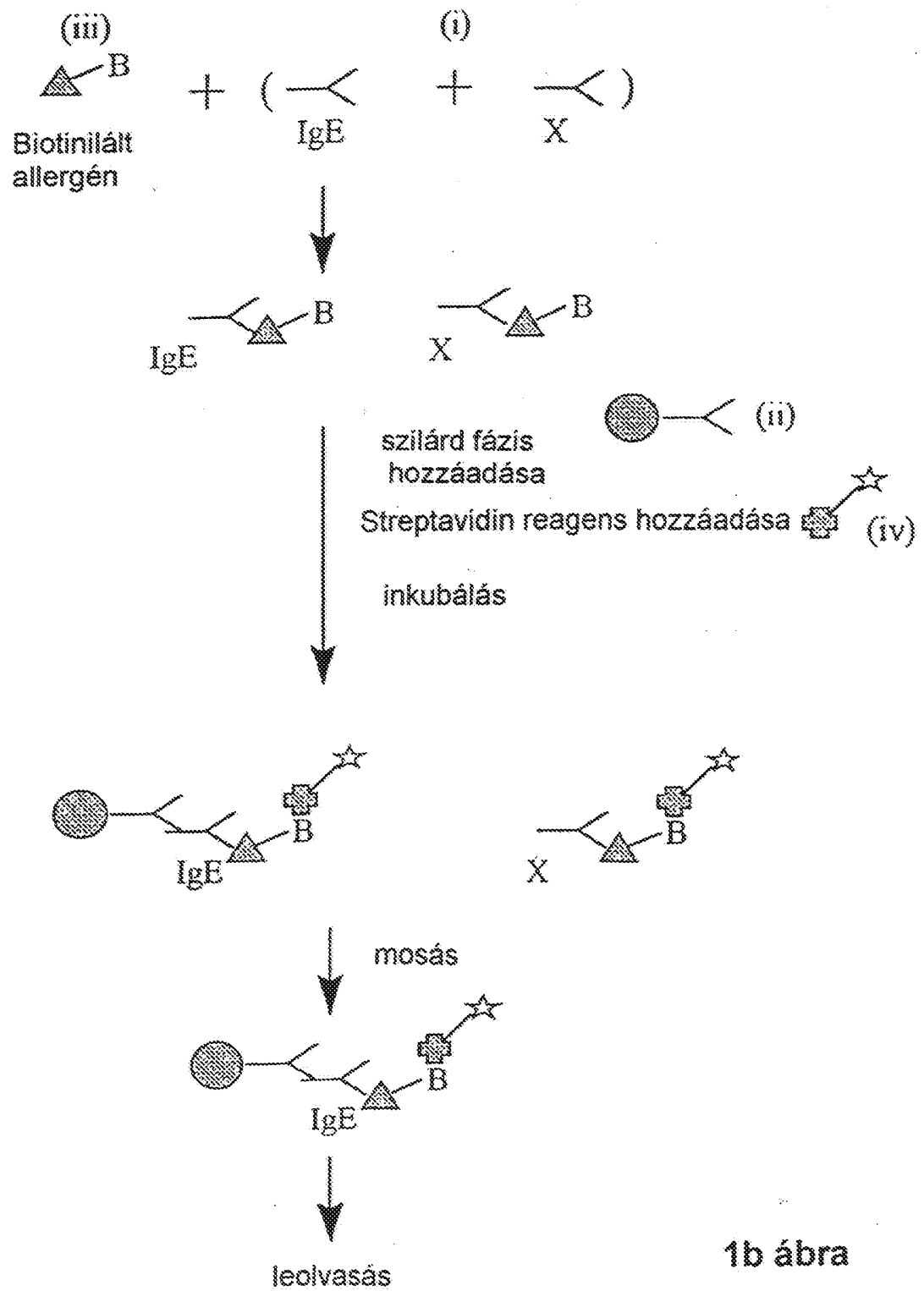
szabadalmi ügyvivő

A technika állása szerinti A) eljárás



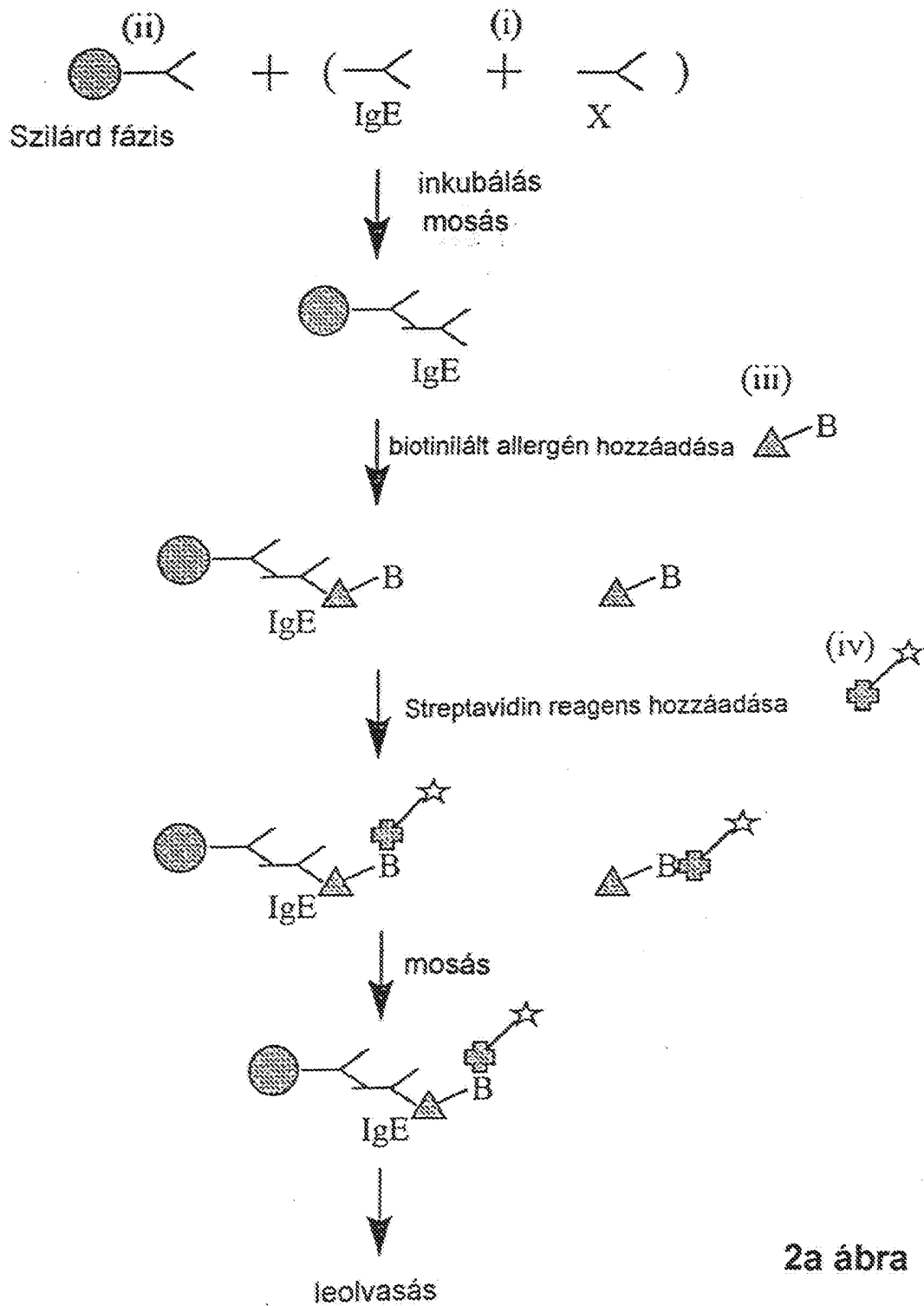
1a ábra

A technika állása szerinti B eljárás



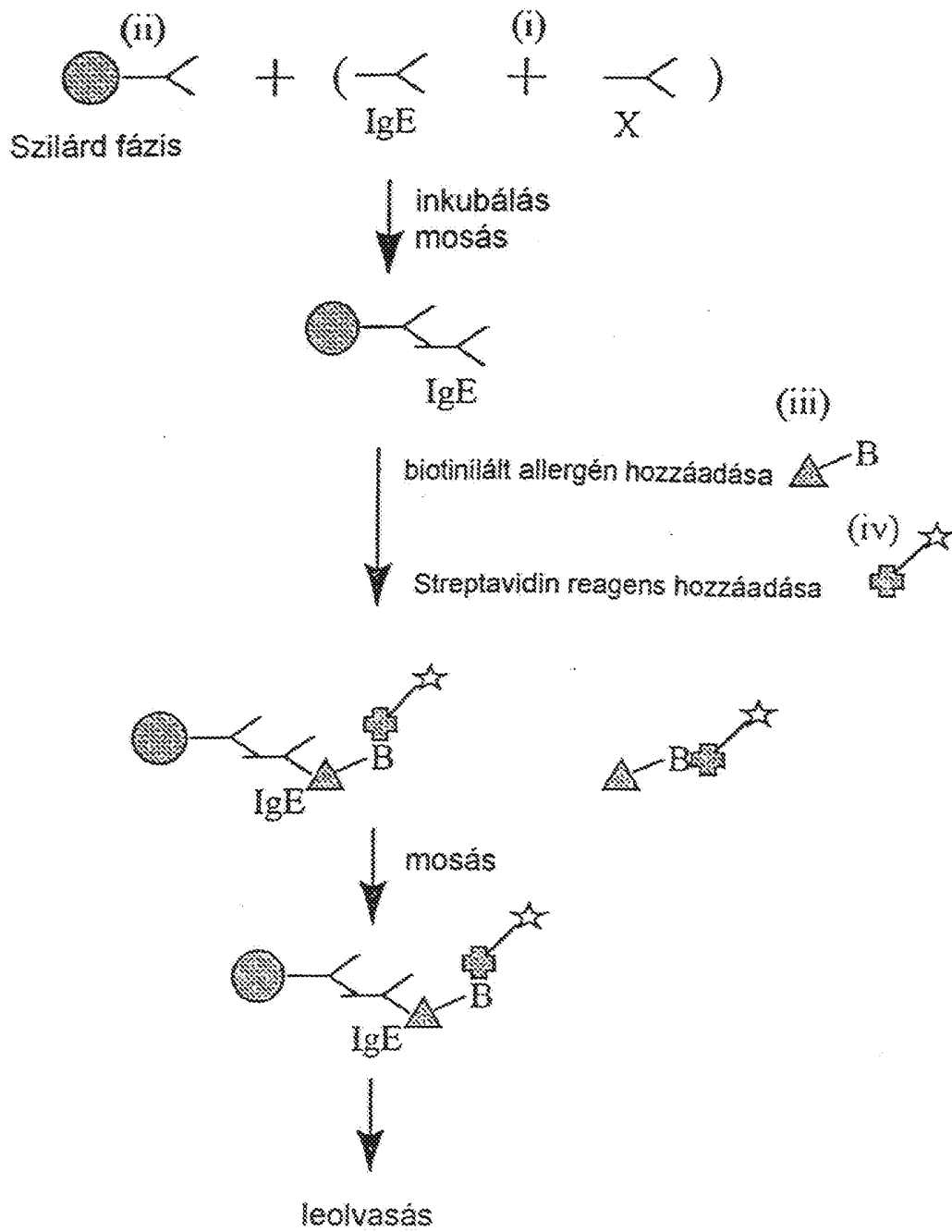
1b ábra

A találmány szerinti 1. eljárás (2. igénypont)



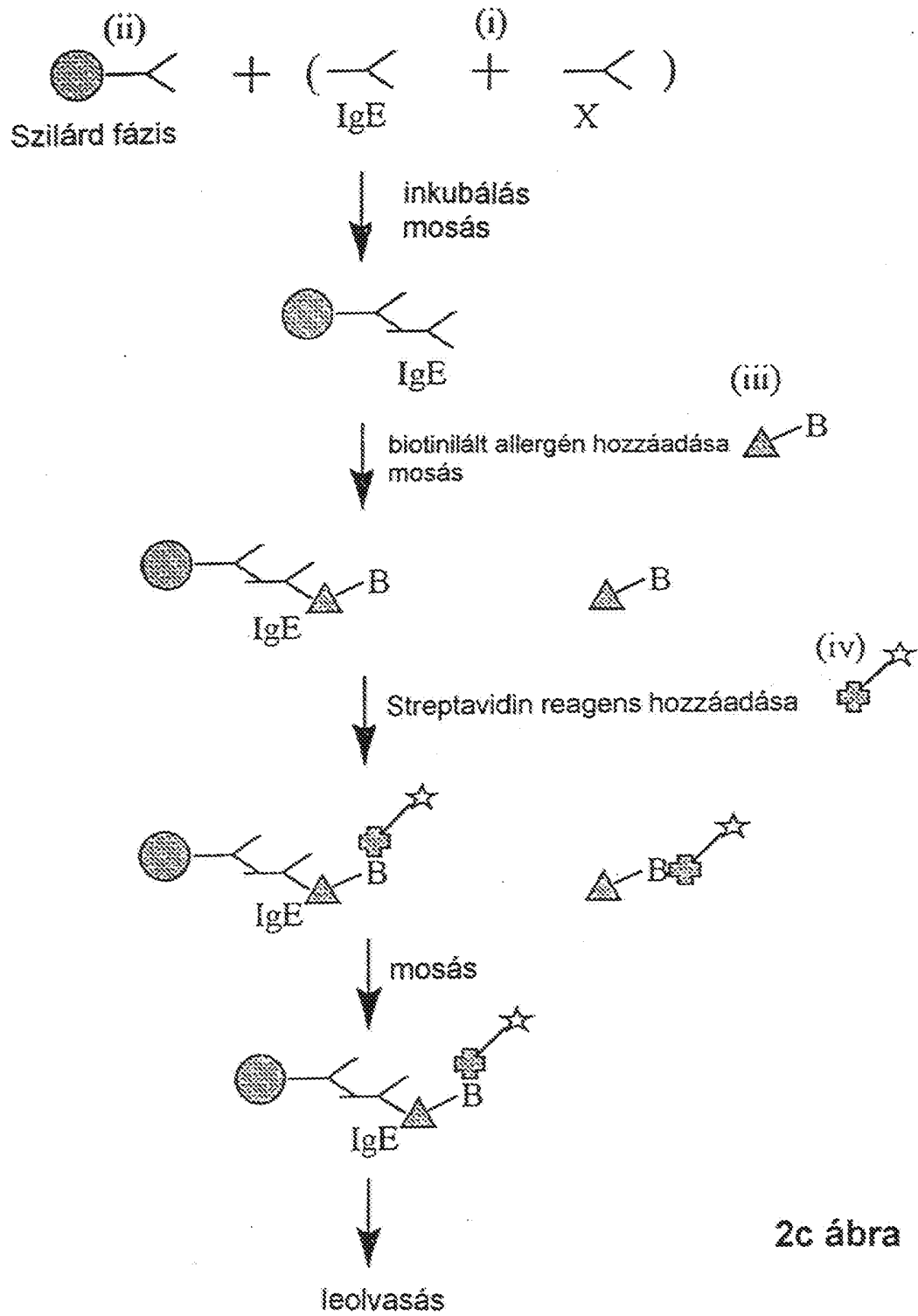
2a ábra

A találmány szerinti eljárás (5. igénypont)



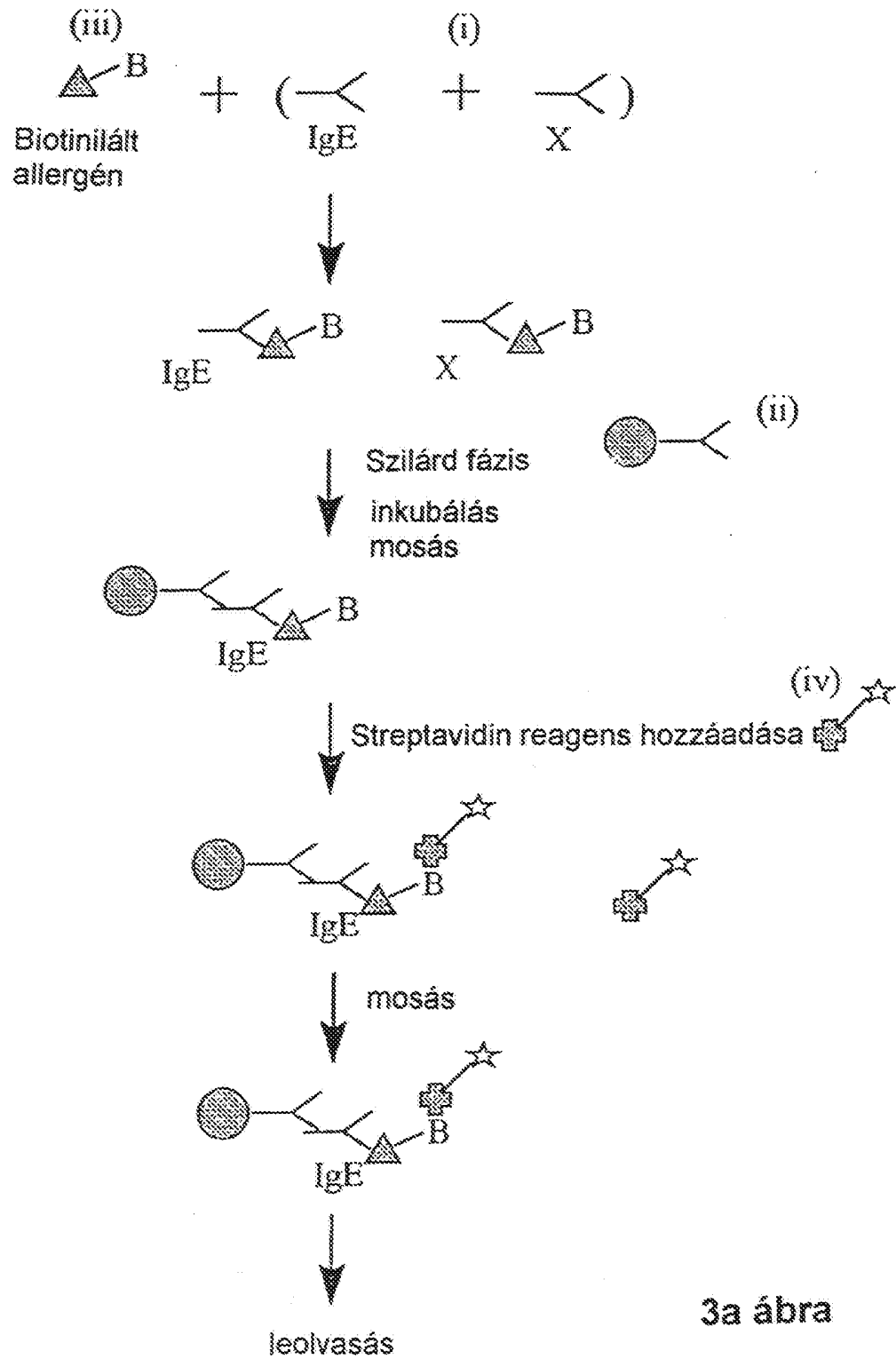
2b ábra

A találmány szerinti eljárás (6. igénypont)



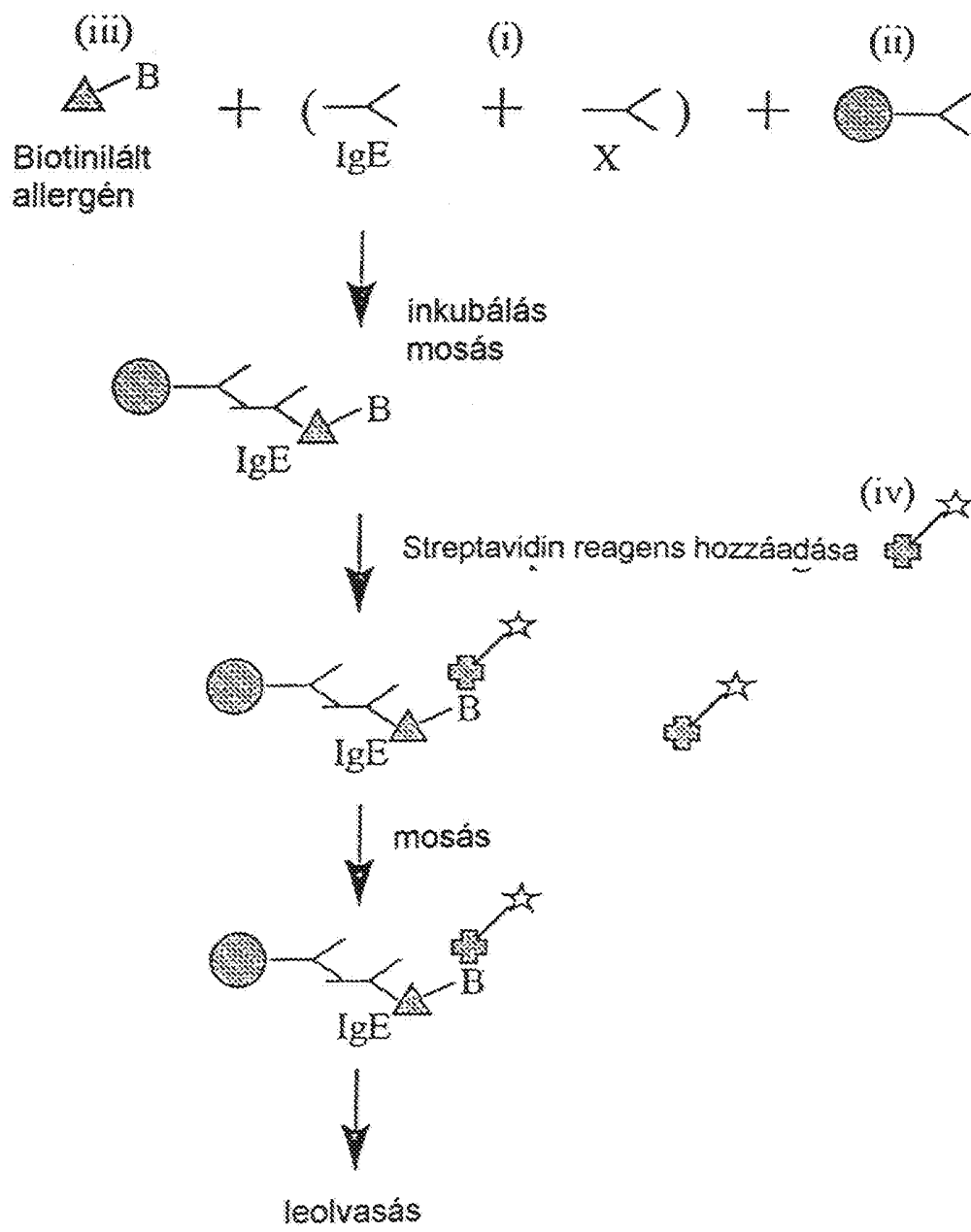
2c ábra

A találmány szerinti eljárás



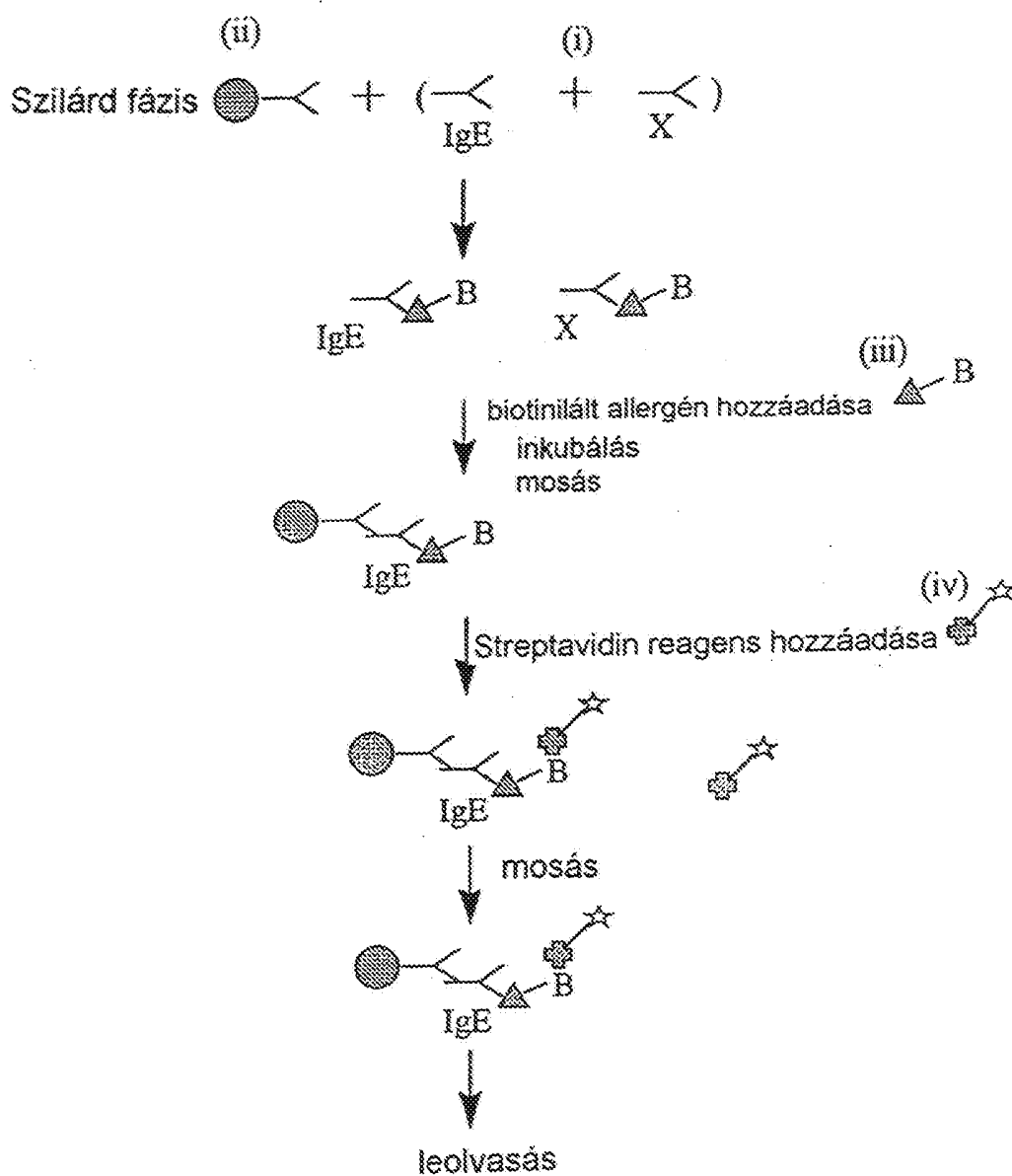
3a ábra

A találmány szerinti eljárás

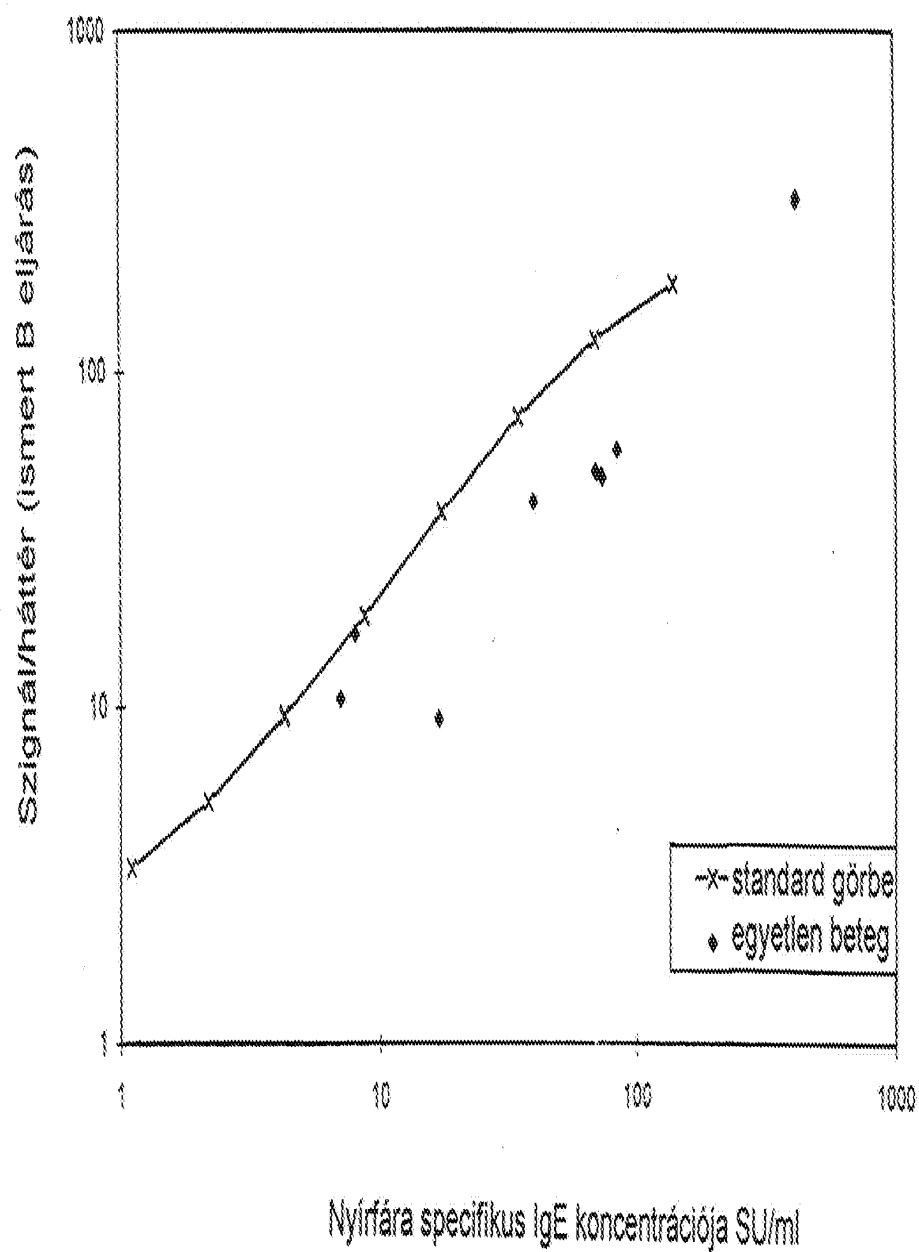


3b ábra

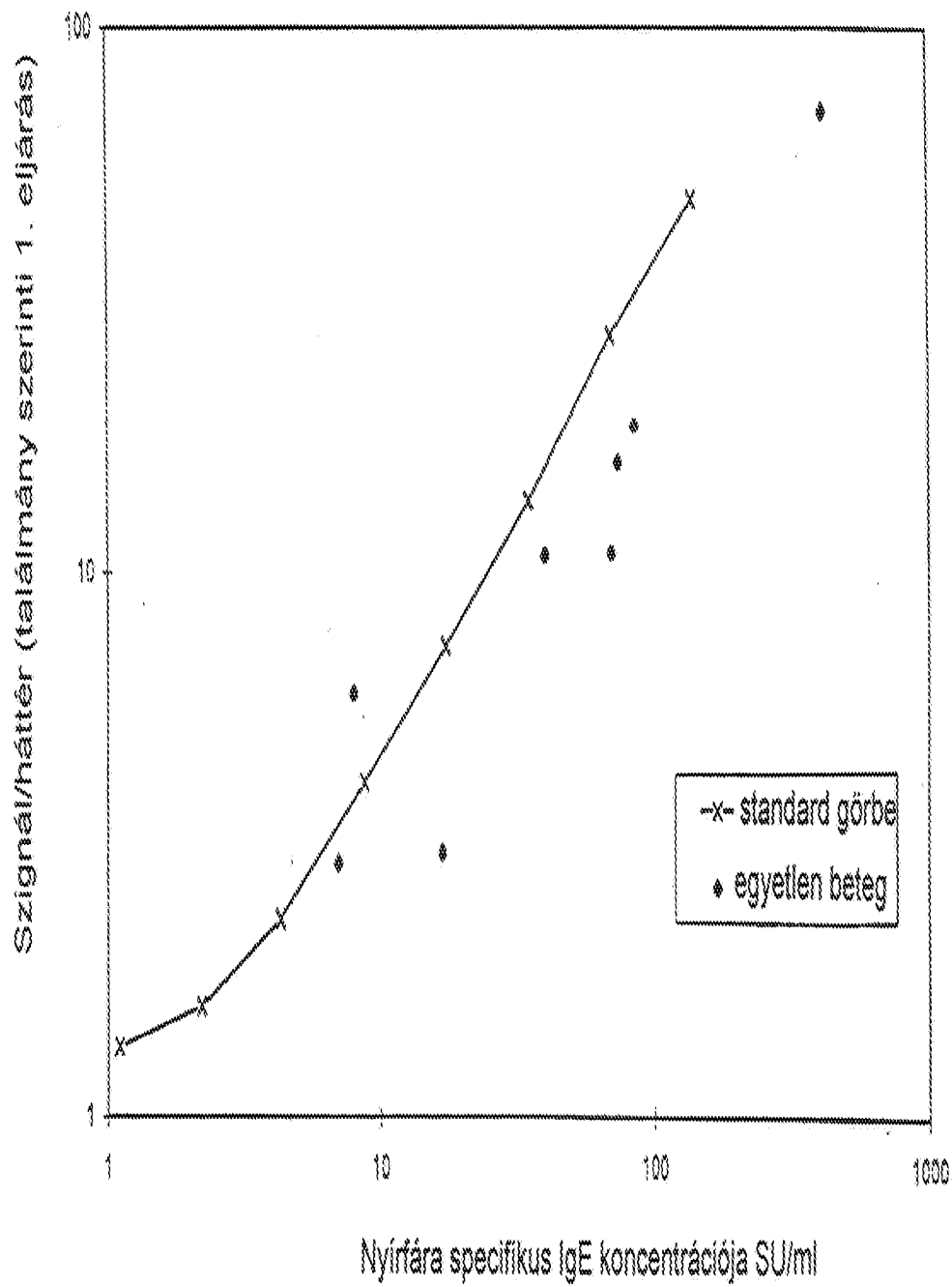
A találmány szerinti aleljárás



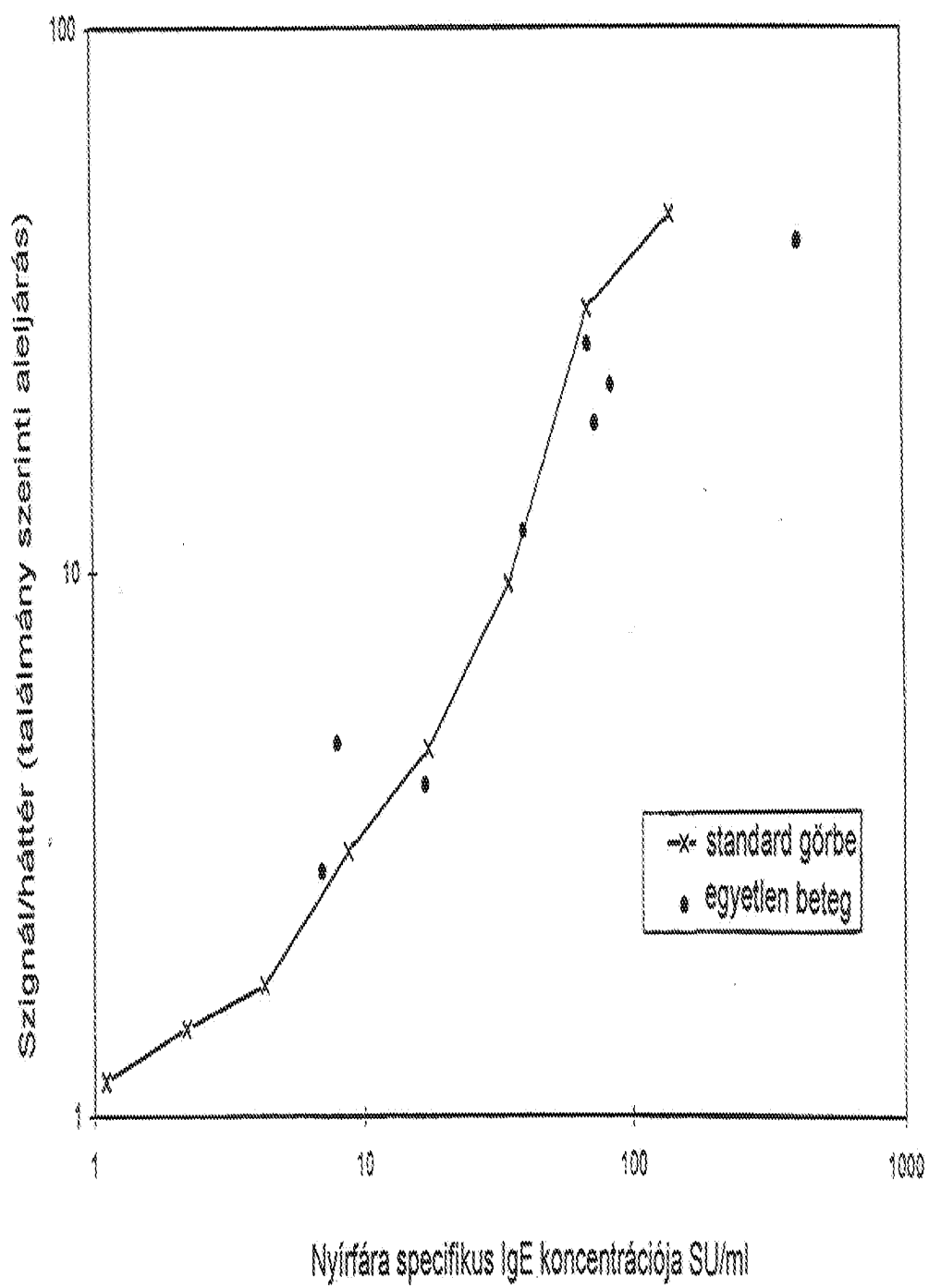
3c ábra



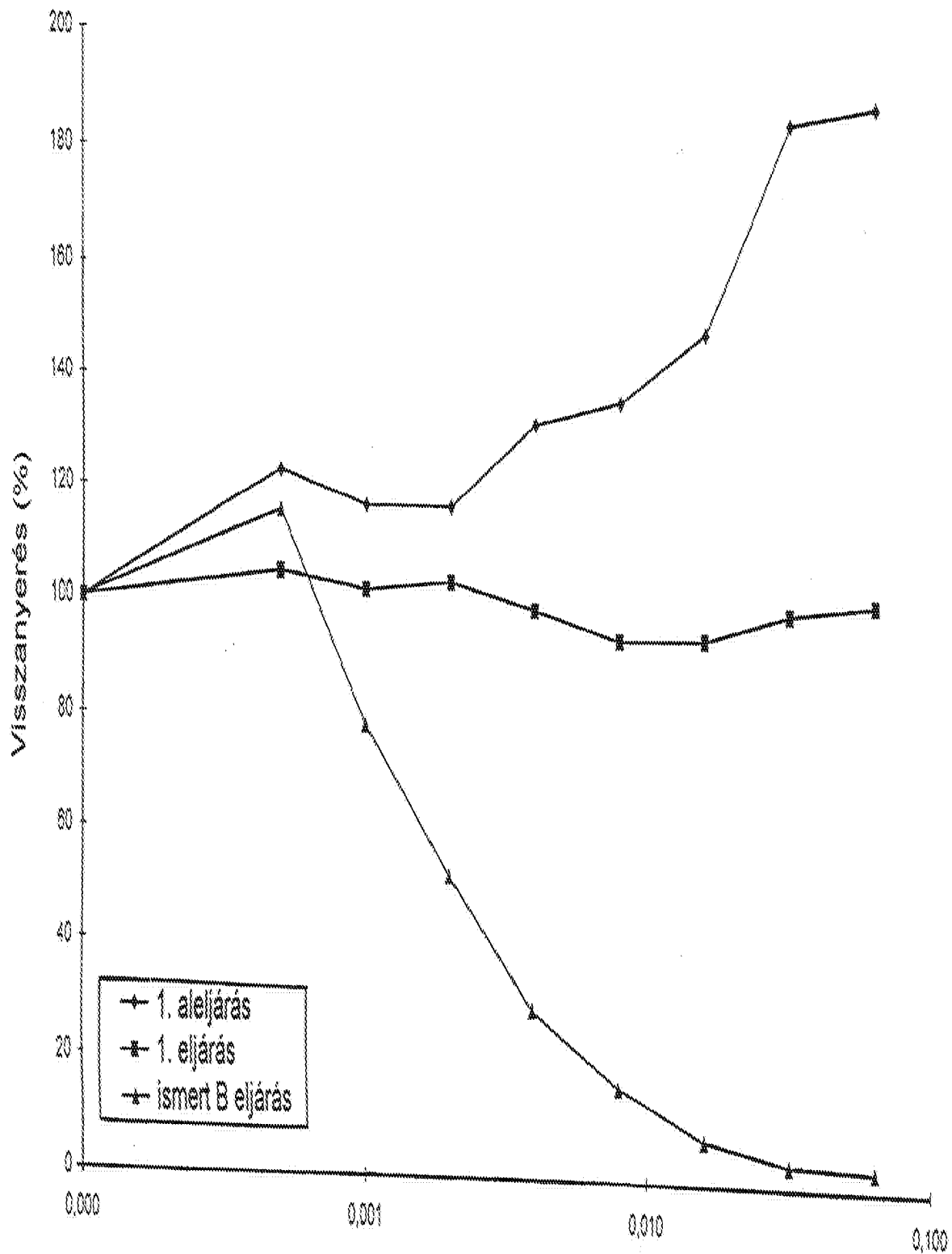
4. ábra



5. ábra

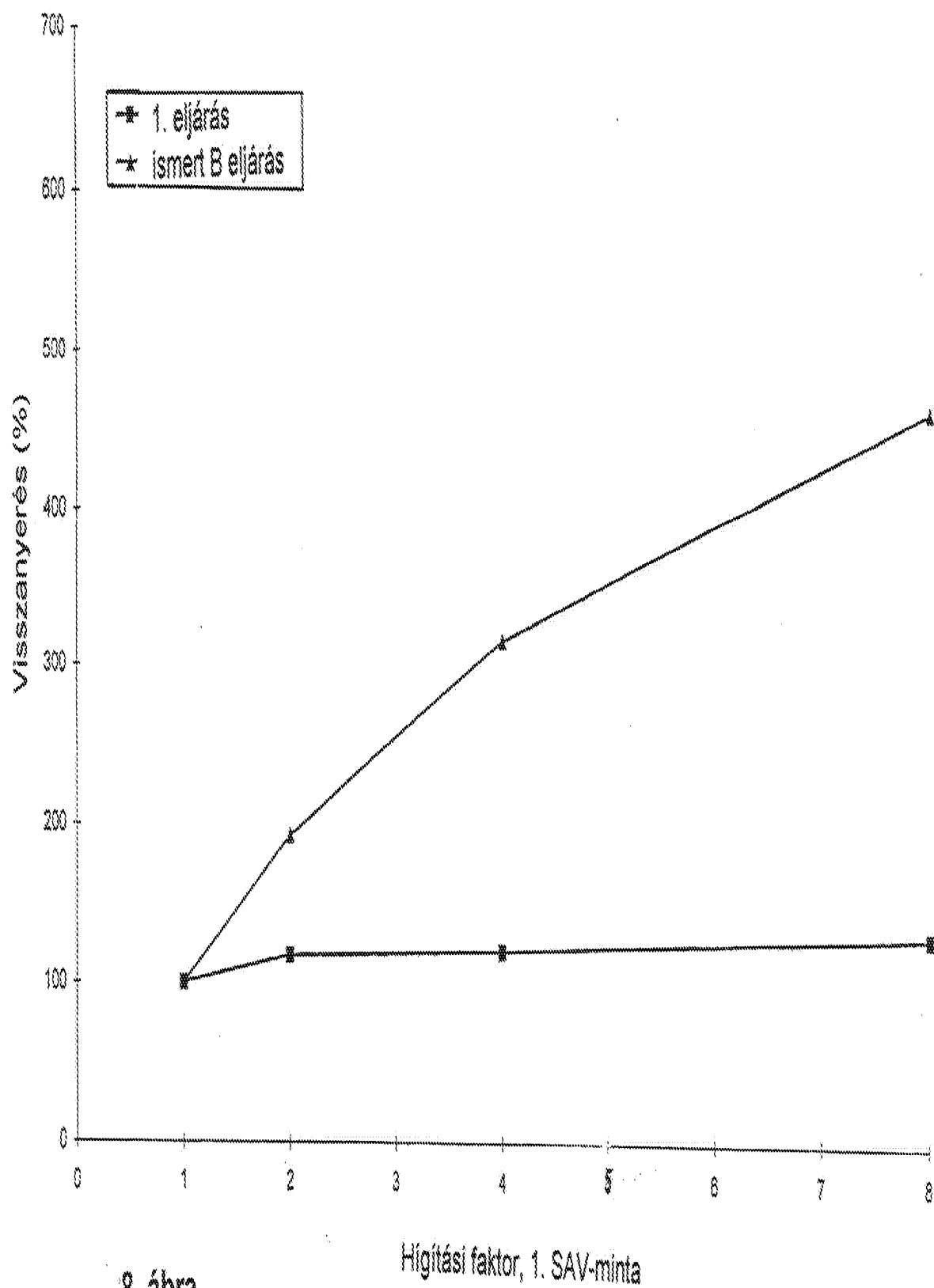


6. ábra



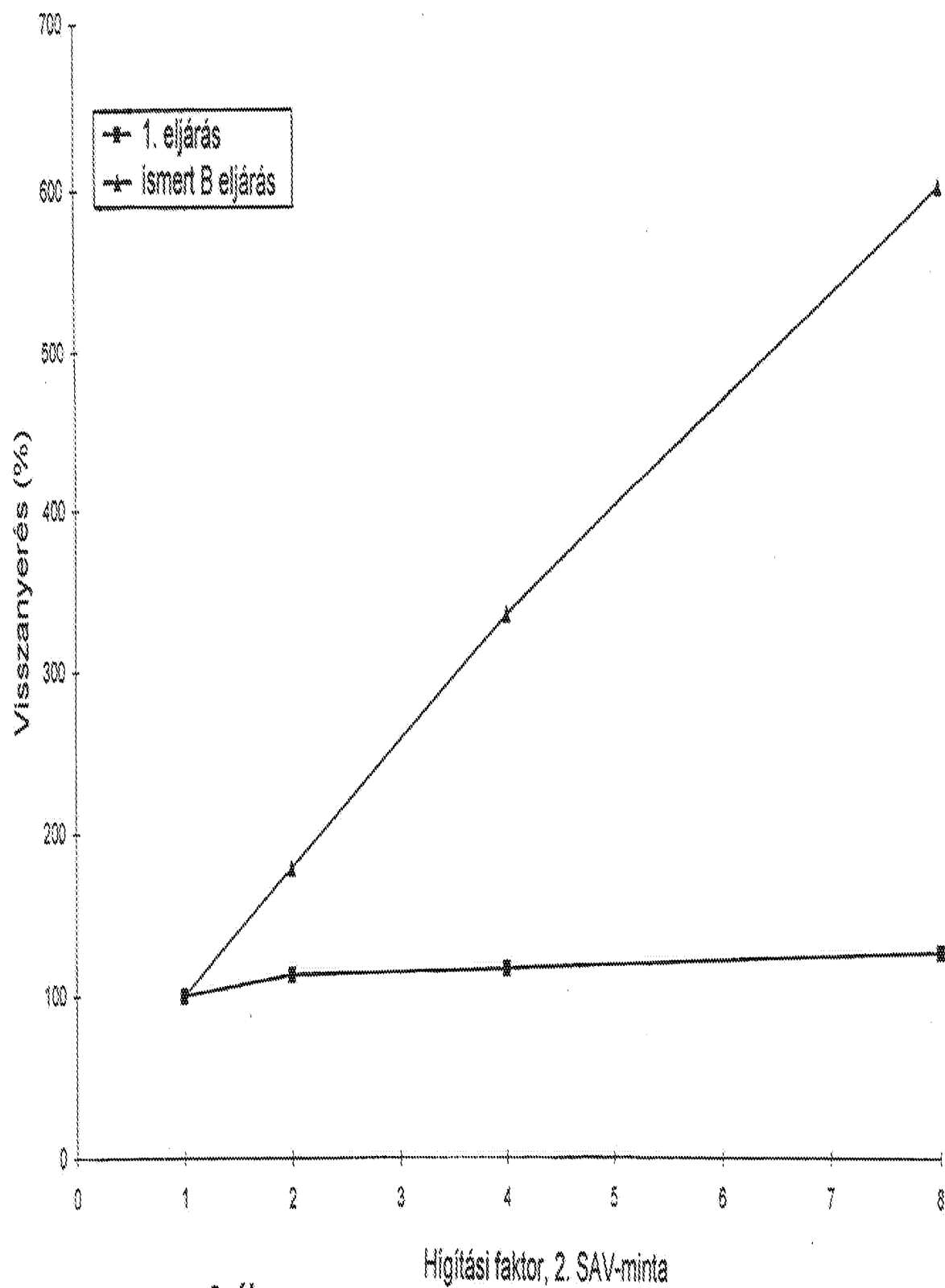
7. ábra

Nyúl eredetű poliklonális anti-Betula verrucosa relativ titere

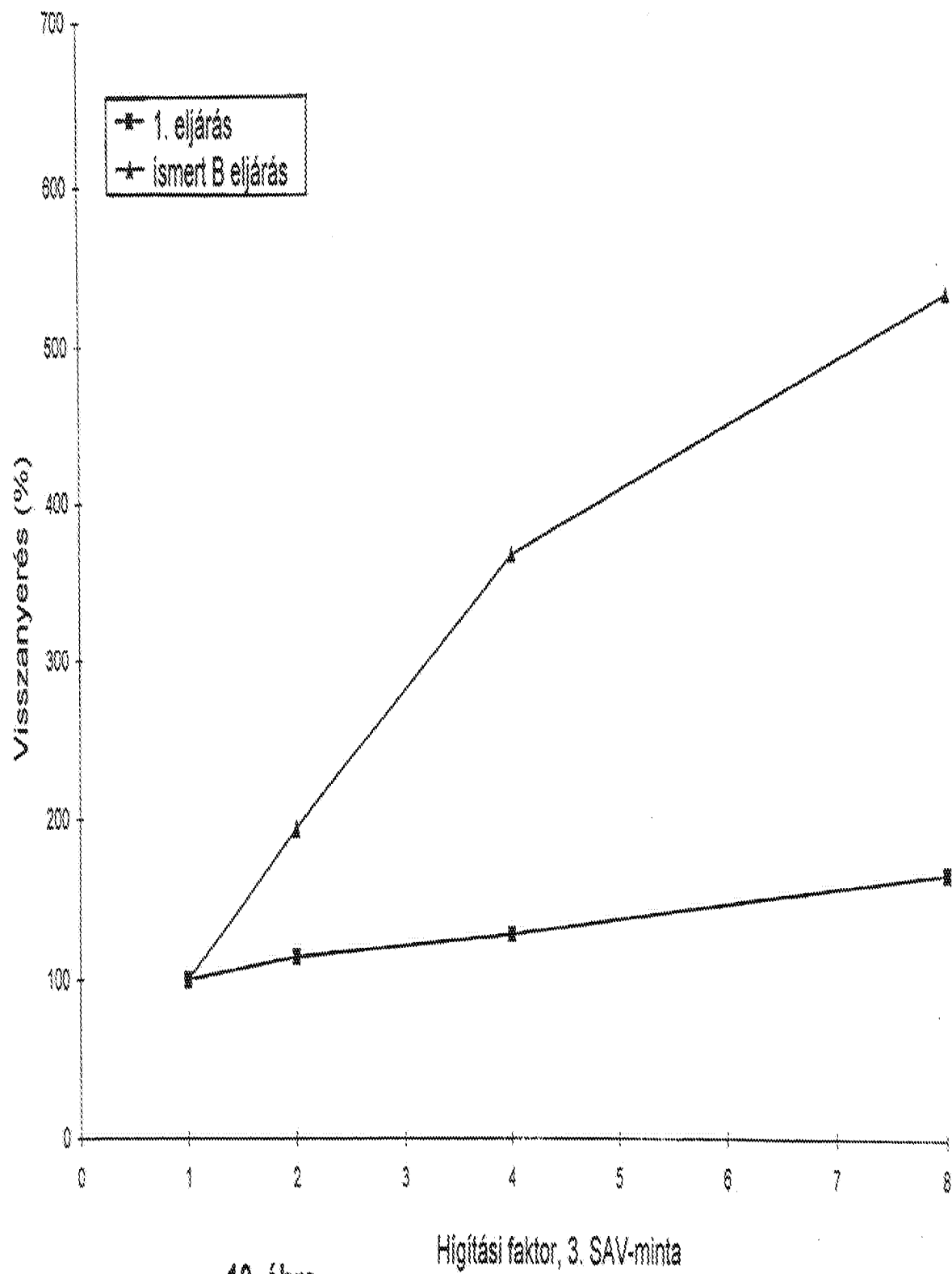


8. ábra

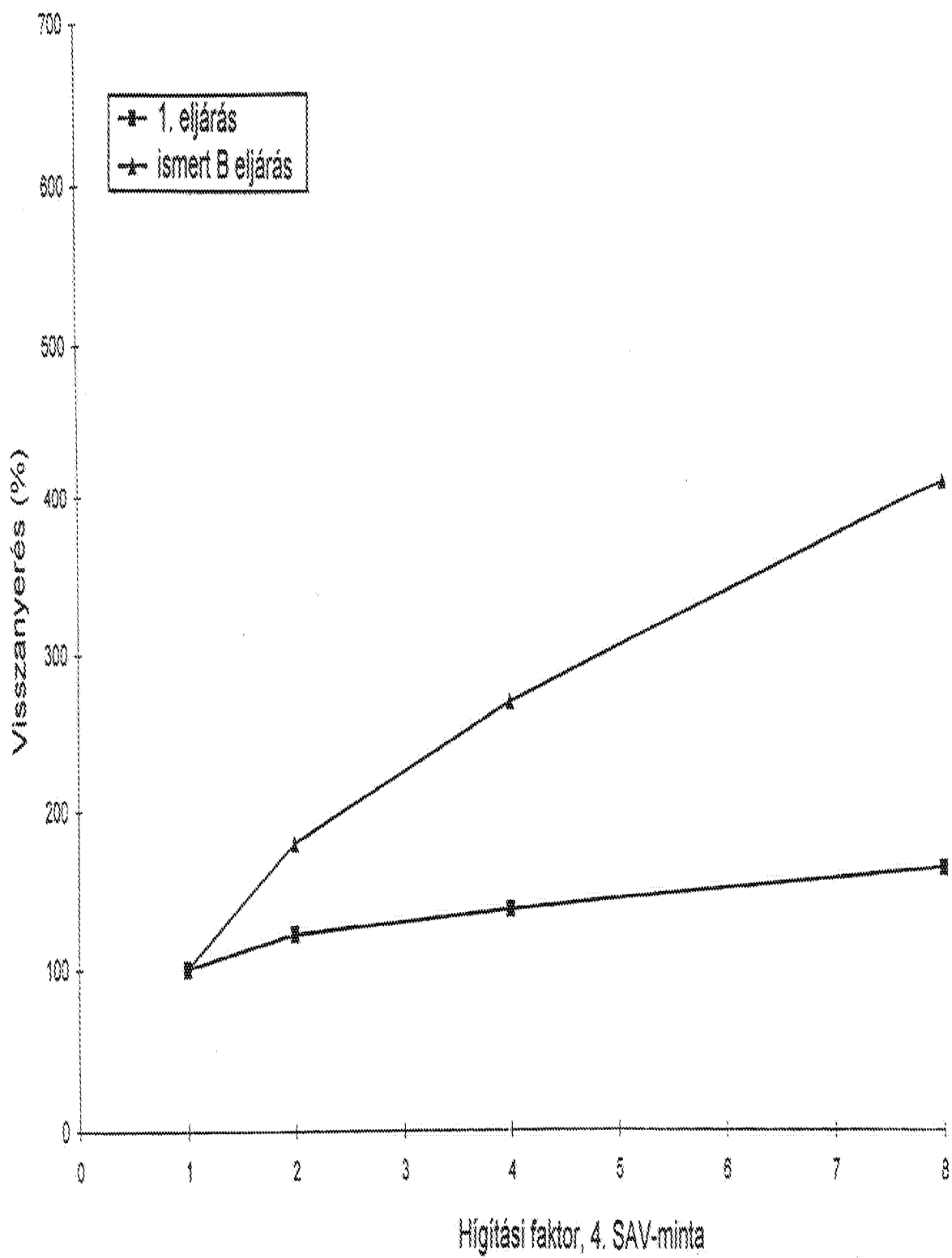
Hígítási faktor, 1. SAV-minta



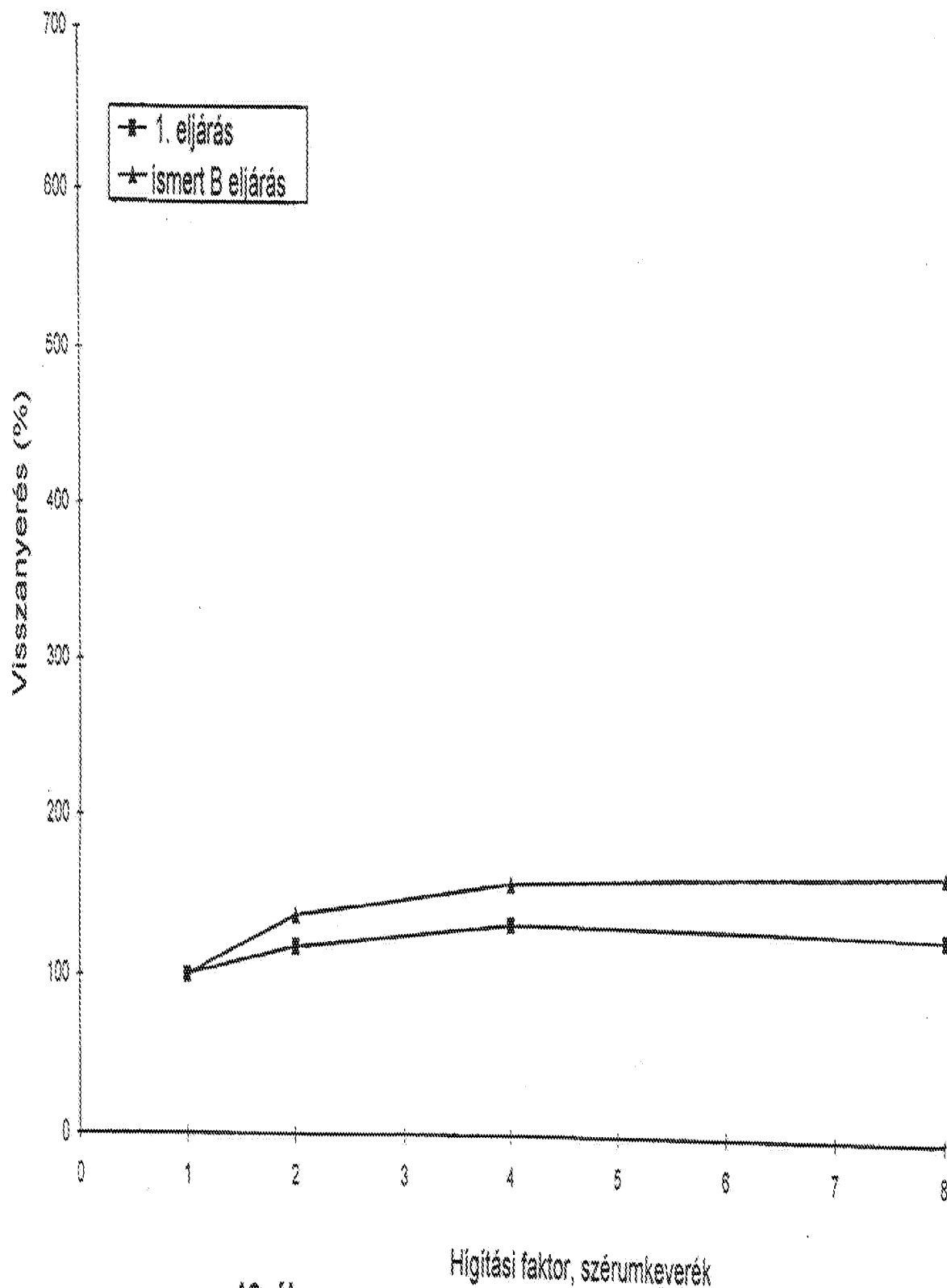
9. ábra



10. ábra

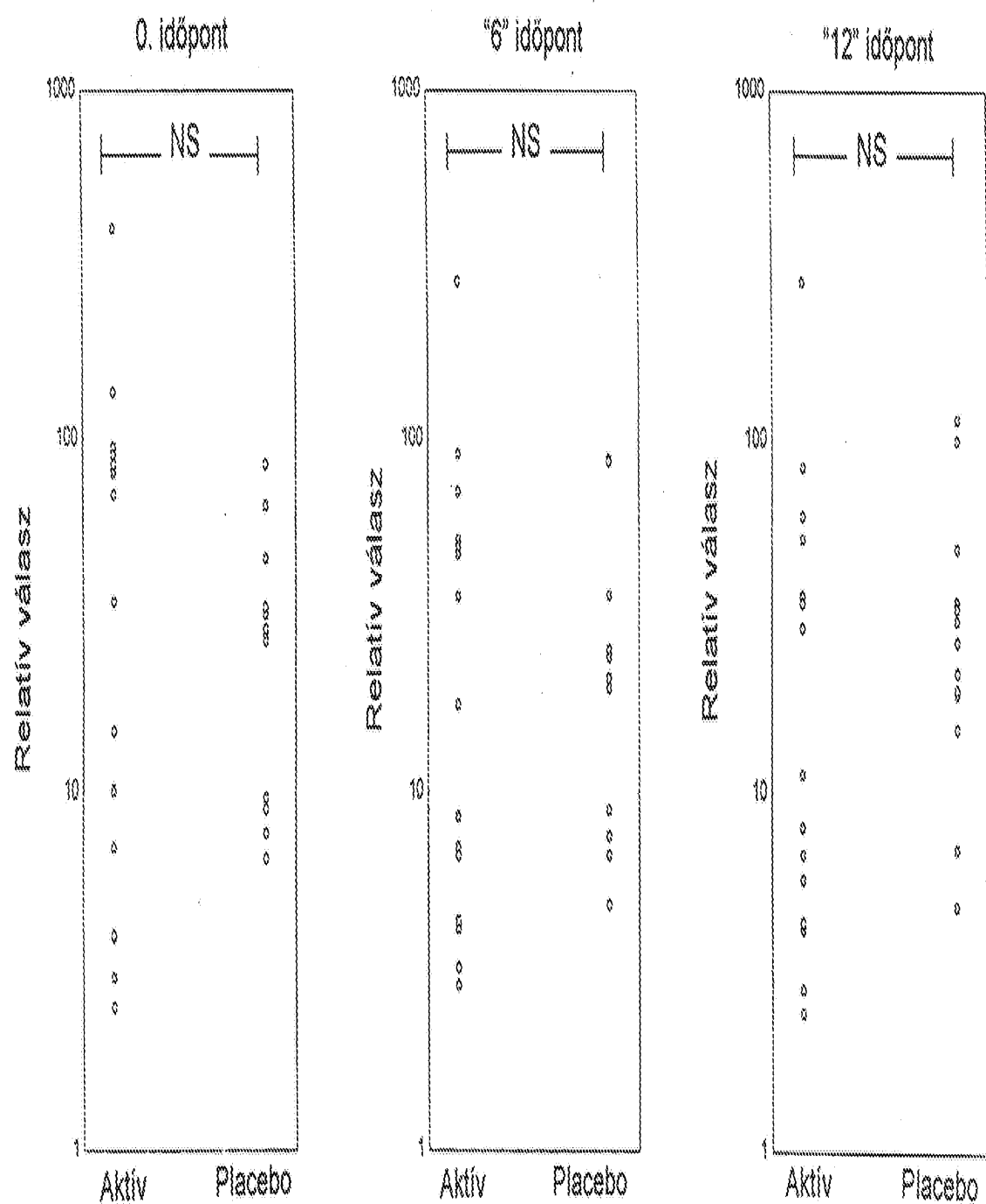


11. ábra



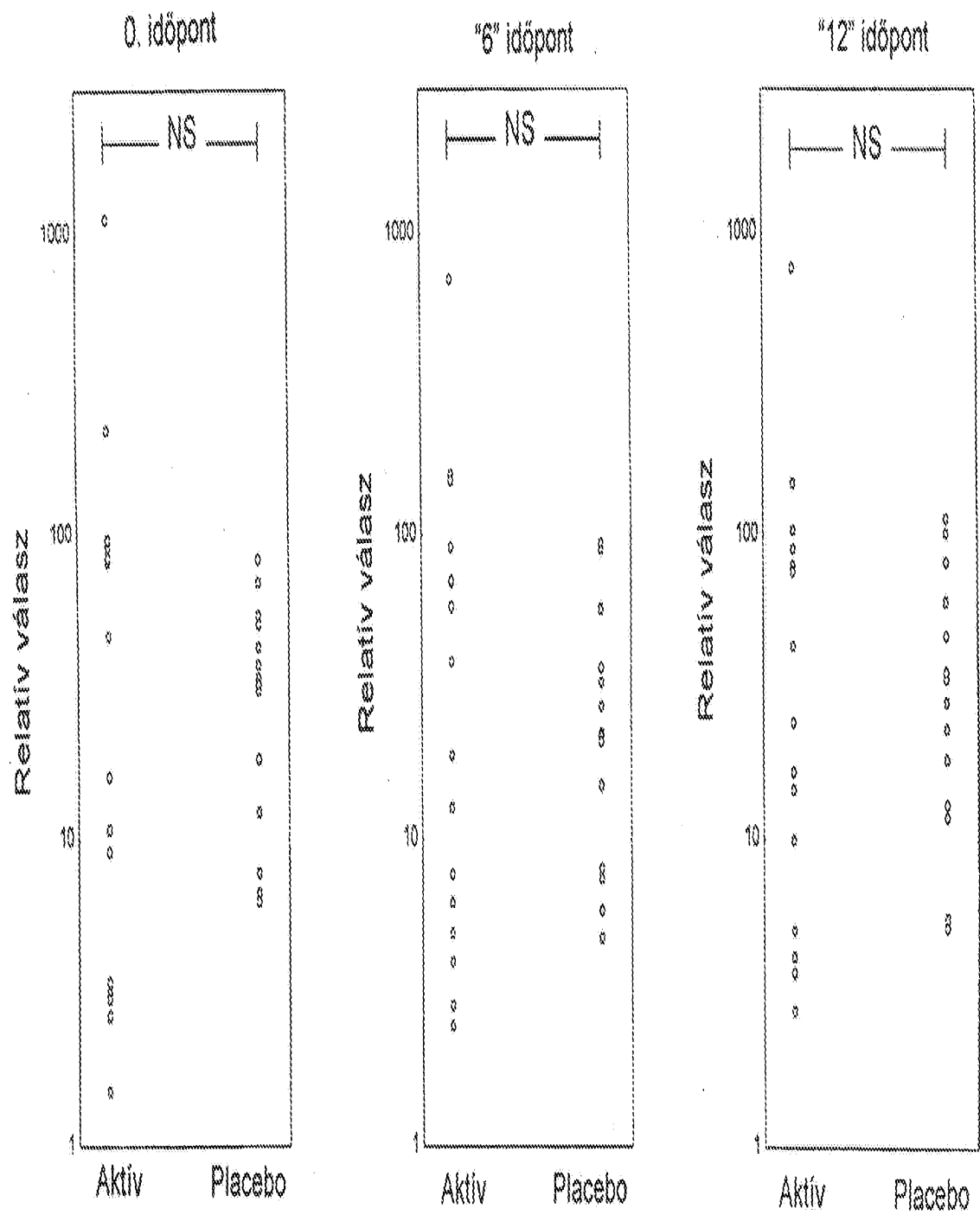
12. ábra

Az ismert B eljárással meghatározott specifikus IgE



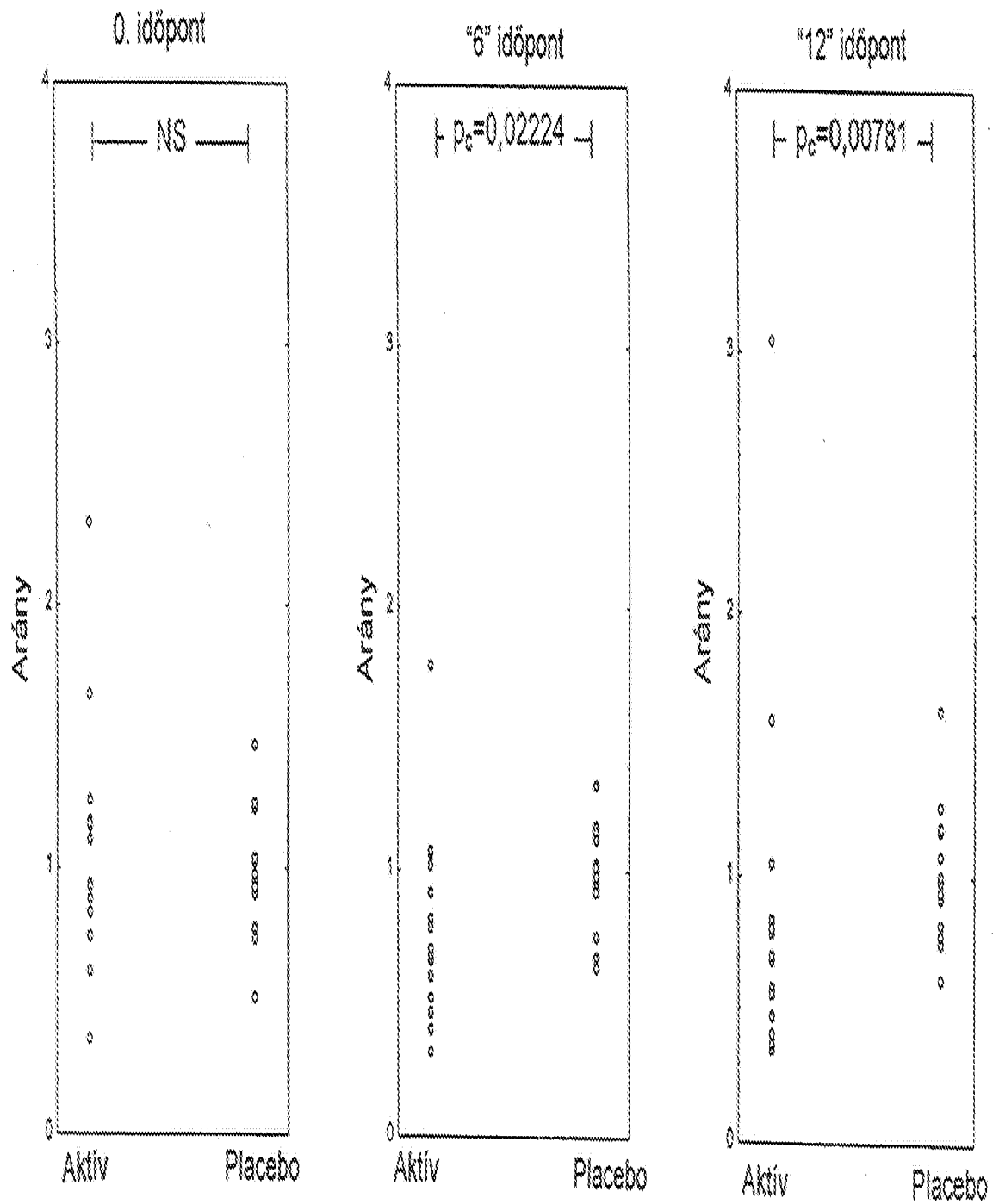
13. ábra

A találmány szerinti 1. eljárással meghatározott specifikus IgE



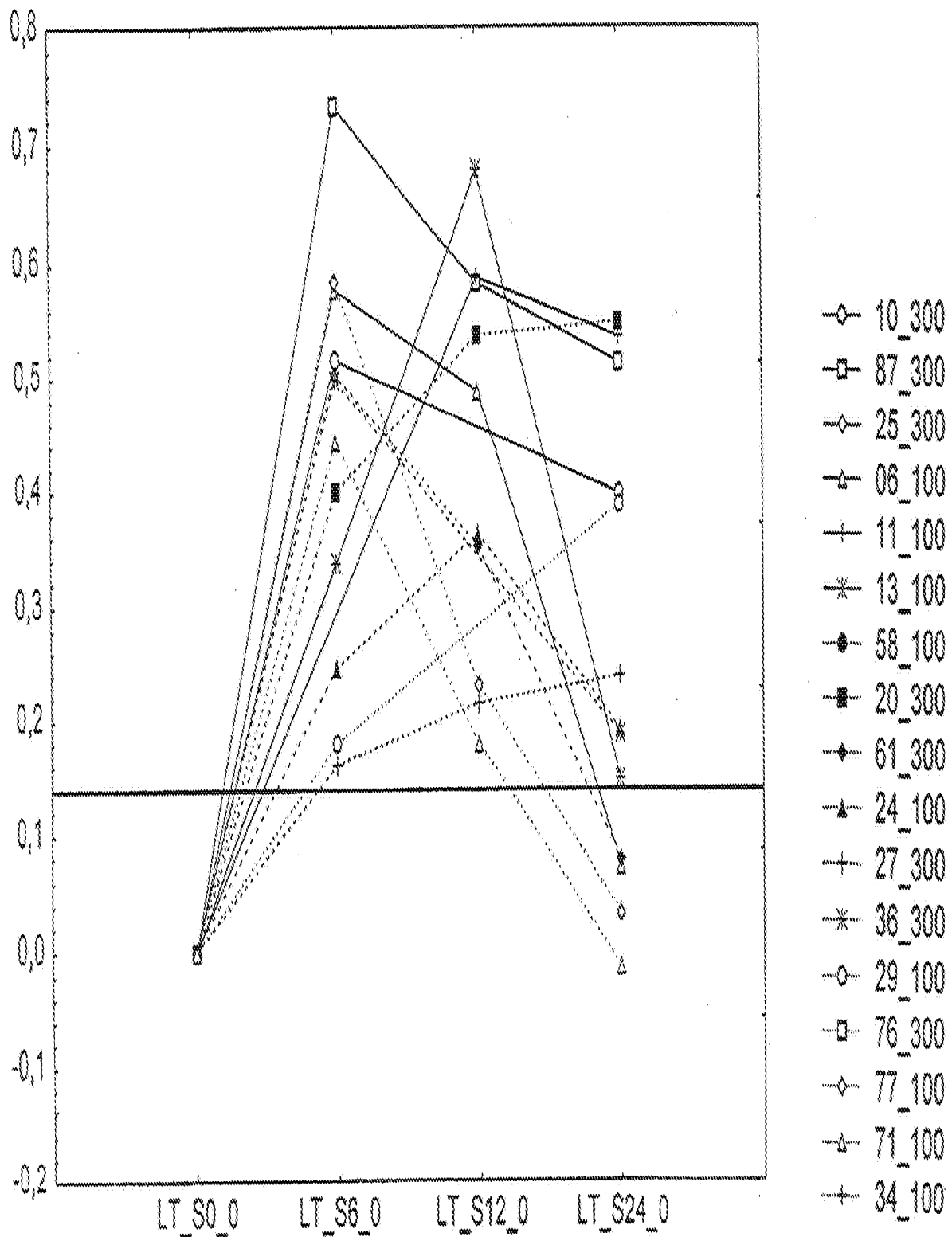
14. ábra

Az ismert B eljárással és a találmány szerinti eljárással
meghatározott specifikus IgE közötti arány



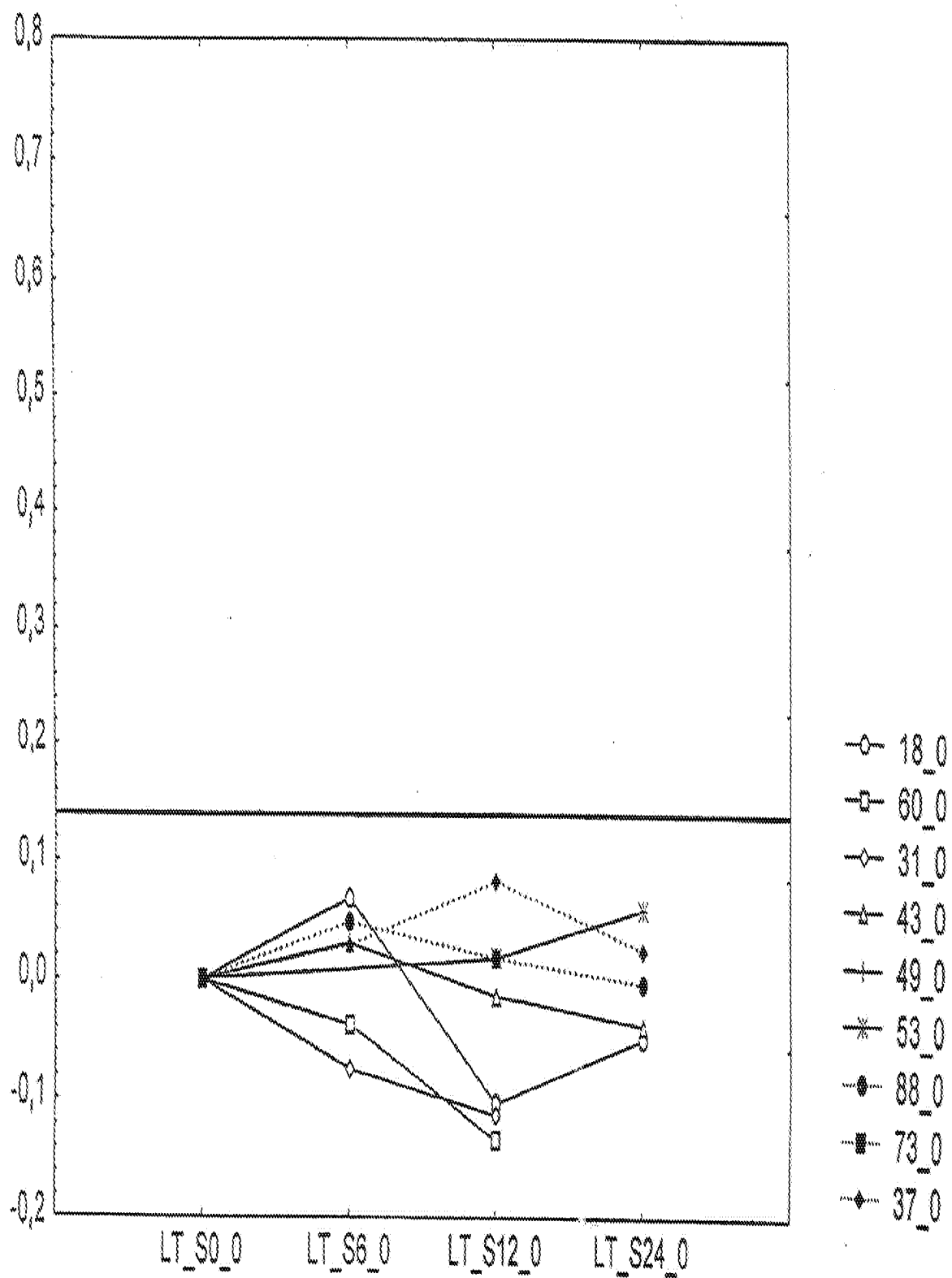
15. ábra

Hatás



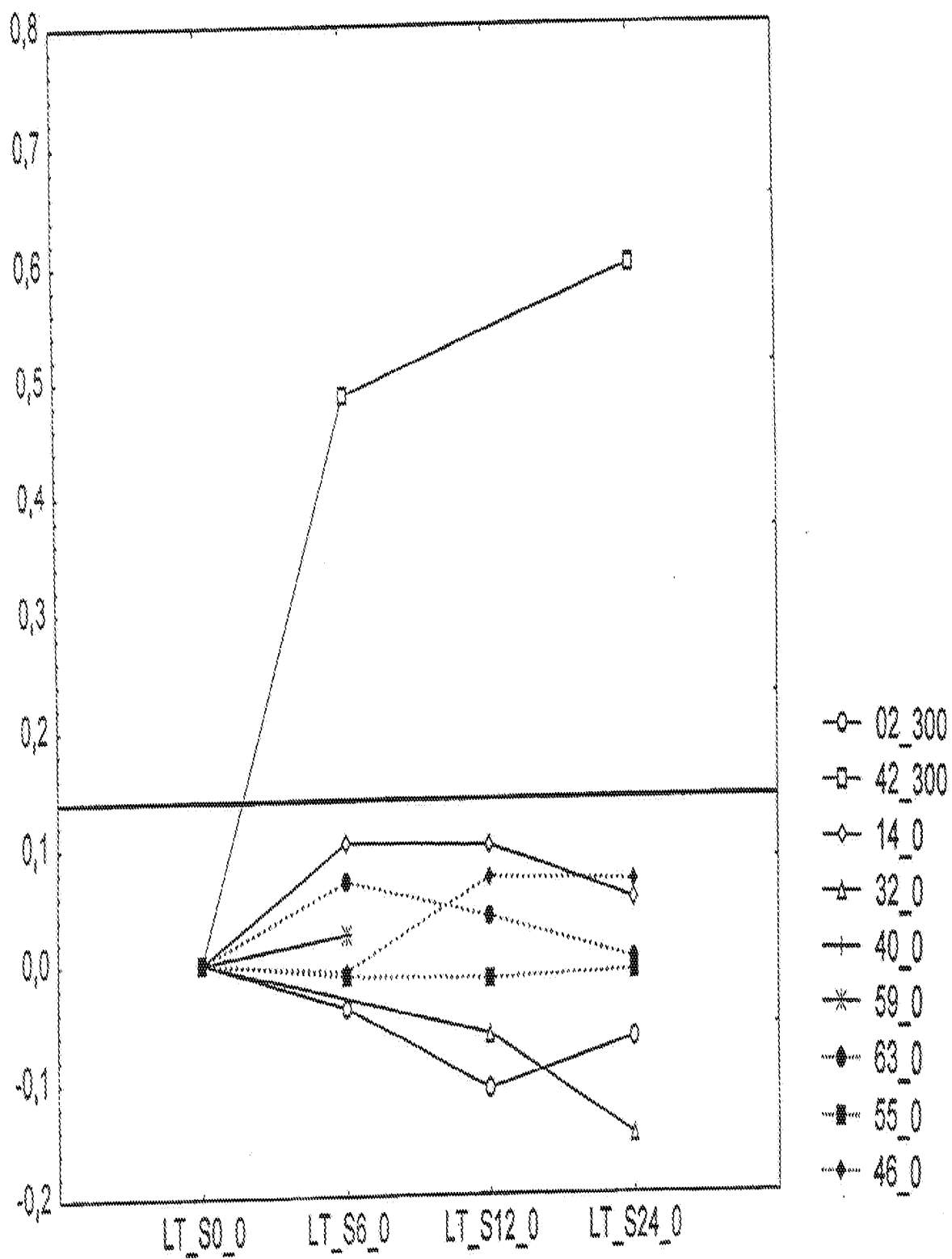
16. ábra

Nincs hatás



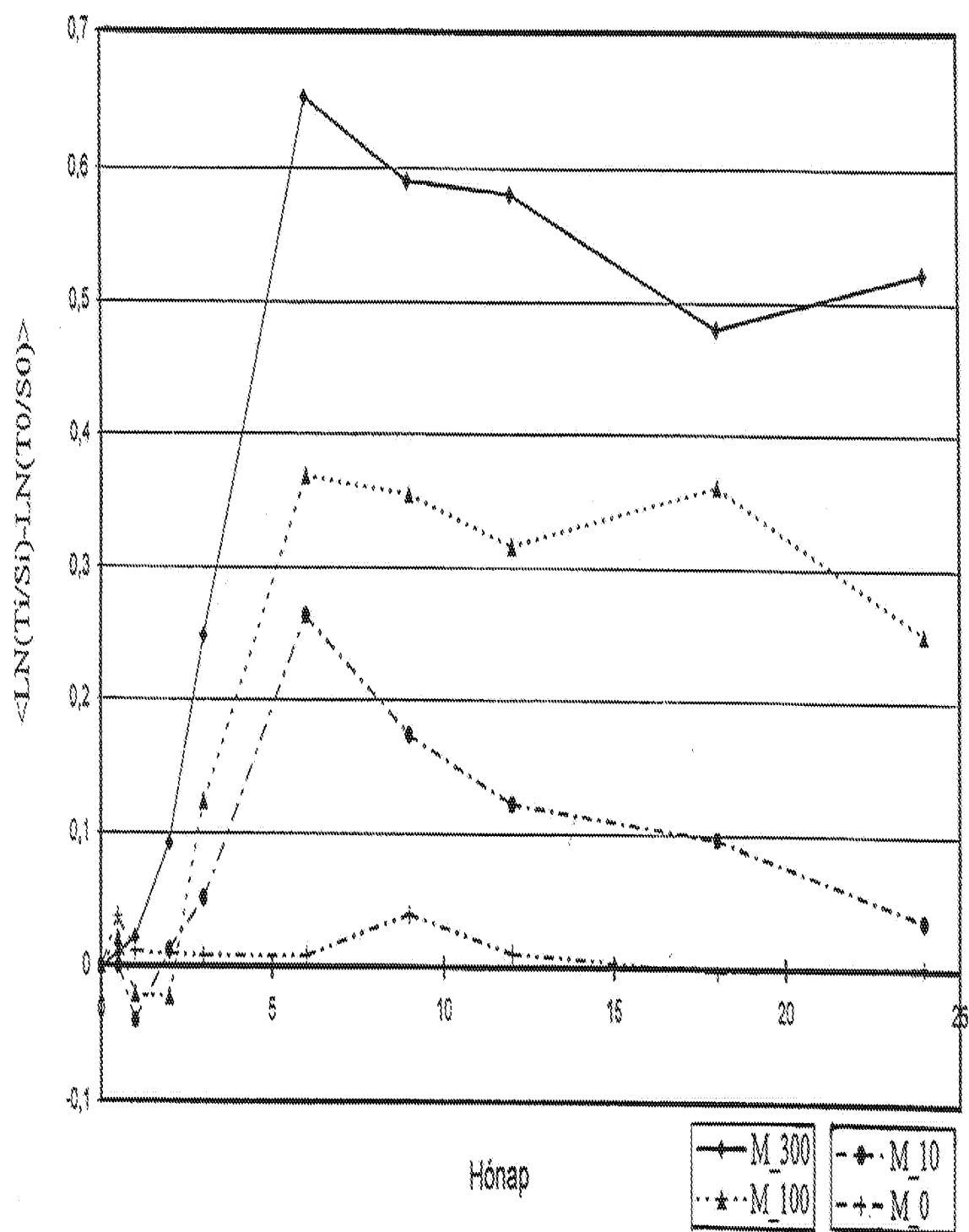
17. ábra

Kétes hatás



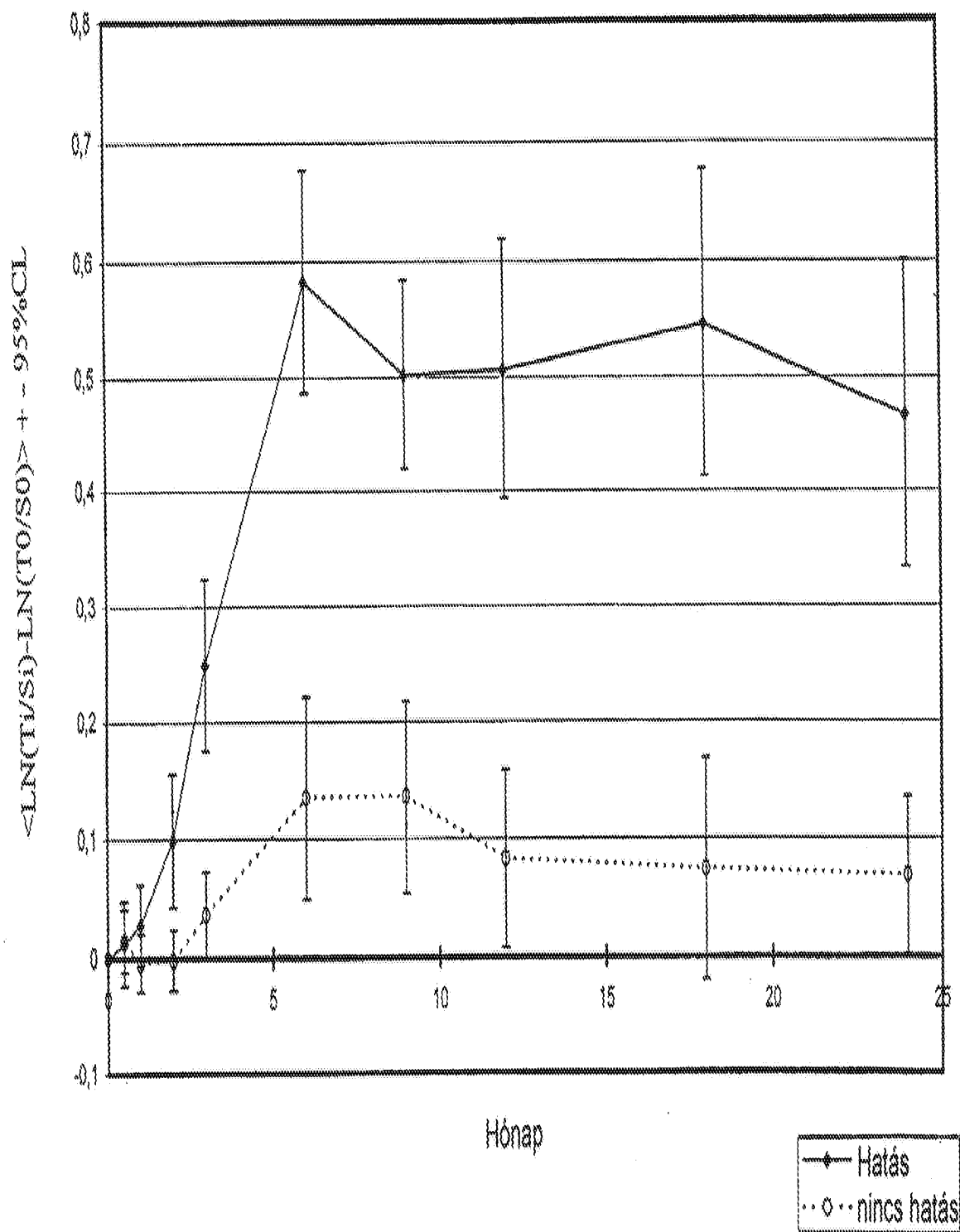
18. ábra

A hatás paraméter dózis-válasz összefüggése



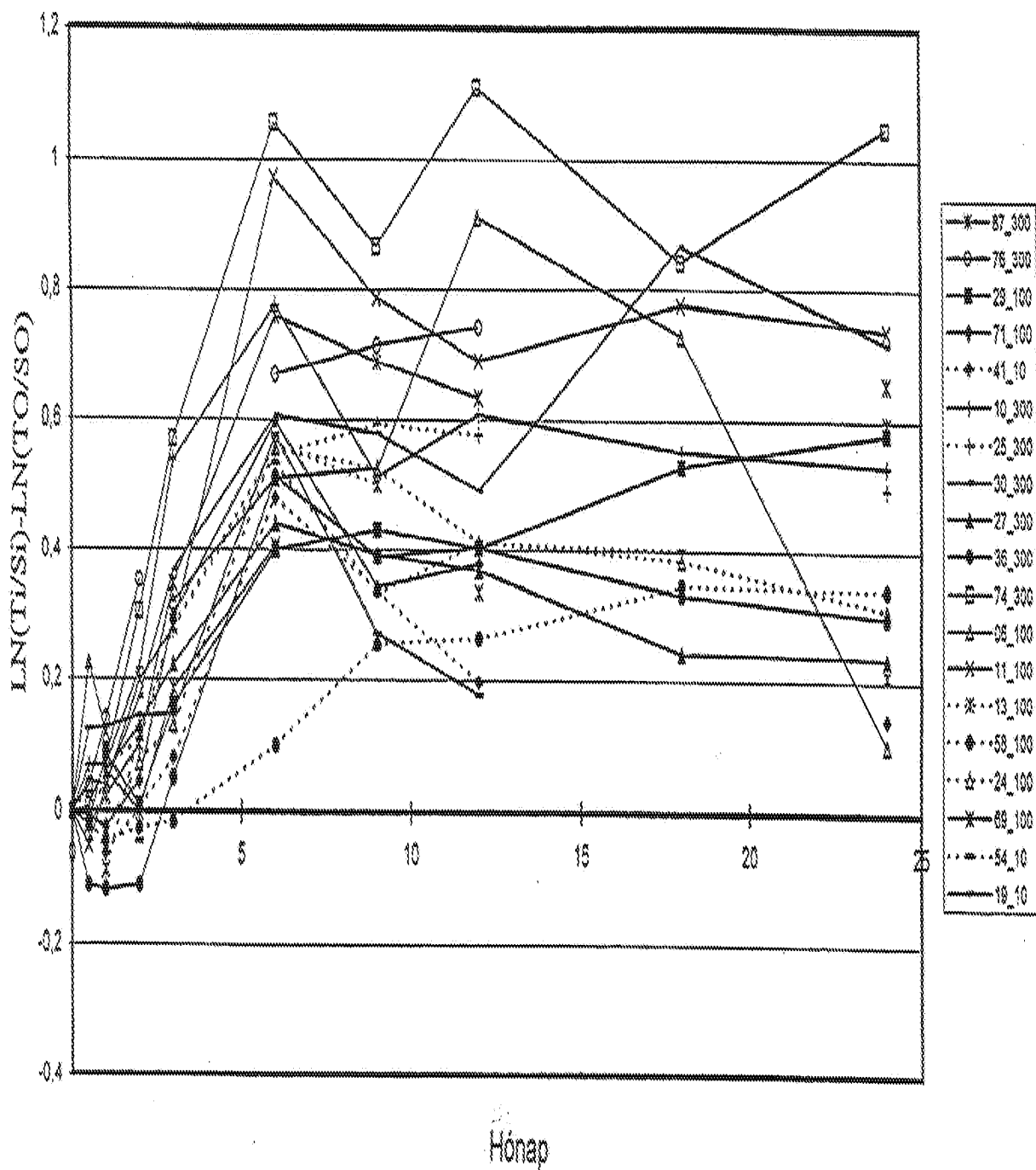
19. ábra

Átlagos hatás

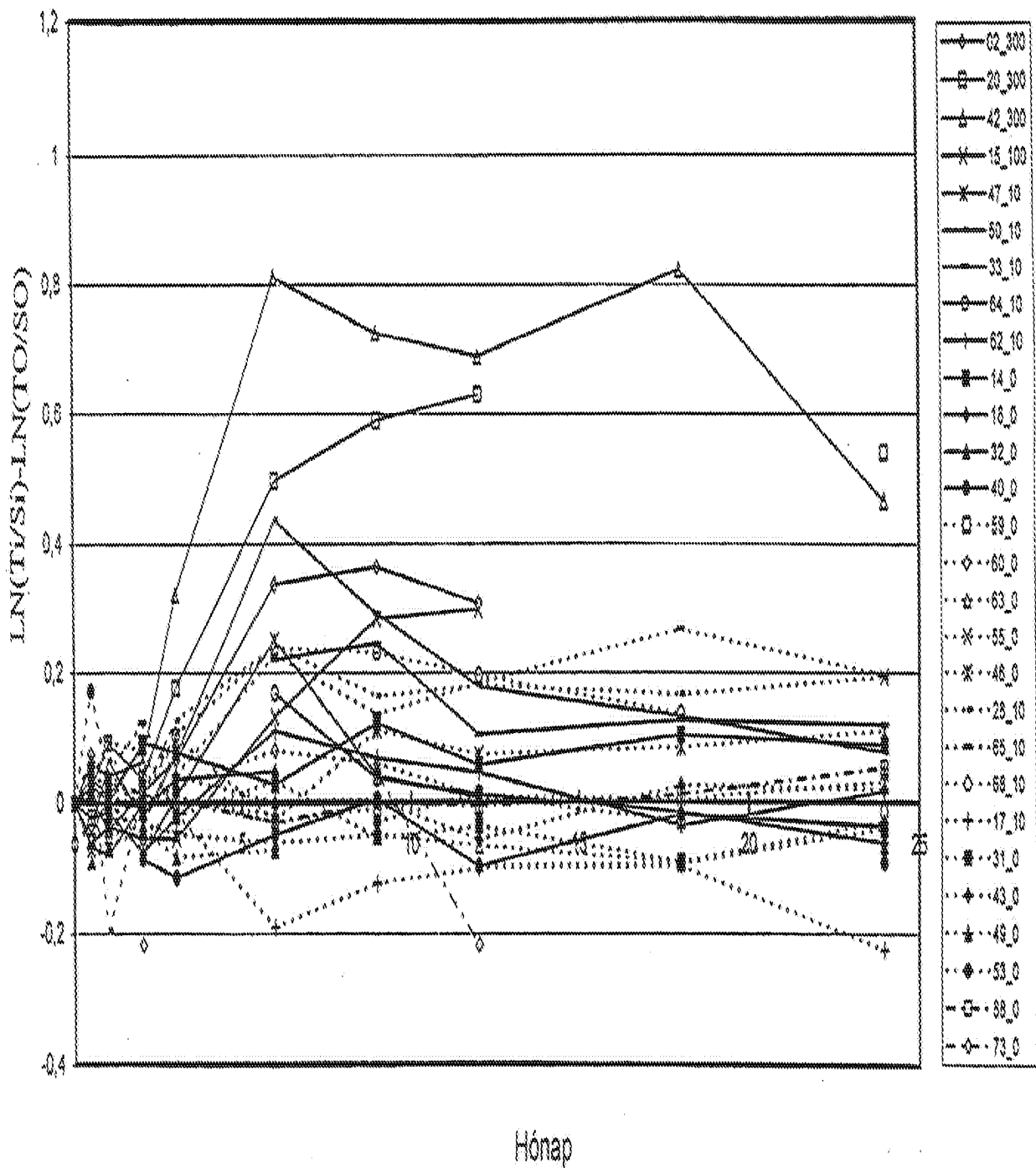


20. ábra

Hatás: egyedi beteg



Nincs hatás: egyedi beteg



22. ábra