

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) FI 930821 A7

**(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **930821**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**G01N 33/536
G01N 33/569
G01N 33/68**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **24.02.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **24.02.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.08.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

25.02.1992 US 841976

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Levine, Robert A., 31 Pilgrim Lane, Guilford Conn. 06437, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Wardlaw, Stephen C., 191 North Cove Road, Old Saybrook Conn. 06475, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Becton Dickinson and Company, One Becton Drive, Franklin Lakes N.J. 07417-1880, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Levine, Robert A., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Wardlaw, Stephen C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Rodriguez, Rodolfo, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Britz, Judith, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Mercolino, Thomas J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Kohdekomponenttien määrittäminen

Bestämning av målkomponenter

Kohdekomponenttien määrittäminen

Tämä keksintö koskee näytteiden kohdekomponenttien määrittäystä. Tarkemmin sanoen tämä keksintö koskee kohteina olevien solujen, hiukkasten tai organismien, joita tämän jälkeen nimitetään "kohteiksi", osoittamista ja/tai paljouden määrittämistä biologisista näytteistä siten että samanaikaisesti muunnetaan kohteiden ominaispainoa ja esiintuodaan tai merkitään kohteet.

US-patentissa 4 181 609, joka on myönnetty 1. tammikuuta 1980 S.C. Wardlaw'lle et al., esitellään verianalyysimenetelmä, jossa eräät verisolut (retikulosyytit) tiivistetään, niin että sentrifugoidussa verinäytteessä muodostuu selvä solujen rajapinta. Siten retikulosyyttien luonnollisen ominaispainon muuttaminen johtaa parannettuun verikokeeseen. US-patentissa 4 332 785, joka on myönnetty 1. tammikuuta 1982 Allenille et al., esitellään spesifinen menetelmä, jossa käytetään fluoresoivia vasta-aineita retikulosyyttien merkitsemiseen verinäytteessä olevien retikulosyyttien kvantitatiivisessa analyysissä; ja US-patentissa 4 591 570, joka on myönnetty 27. toukokuuta 1986 Changille, esitellään monien erilaisten vasta-aineiden, jotka on sijoitettu kantajan pinnalle, käyttö monien erilaisten antigeenien sieppaamiseksi immunoanalyysimenetelmässä. Alalla ei kuitenkaan aikaisemmin ole esitelty yleistä menetelmää, johon liittyy monien erilaisten näytteen komponenttien ominaispainon muuttaminen muutettujen komponenttien kokoamiseksi yhteen sentrifugoidussa näytteessä ja komponenttien merkitseminen niiden tekemiseksi helposti identifioitaviksi.

Tämä keksintö koskee näytteiden kohdekomponenttien parannettua määrittäystä, johon liittyy havaittavasti erottuvien liposomien kiinnittäminen selektiivisesti kulloisiinkin näytteen kohdekomponentteihin. Liposomit kiinnitetään näytteen komponentteihin liposomien pinnalle kiin-

nitettyjen vasta-aineiden avulla. Vasta-aineisiin sisältyy vähintään yksi vasta-aine, joka on spesifinen pinta-antigeenille, jonka tiedetään esiintyvän näytteen kohdekomponentin pinnalla. Voidaan samanaikaisesti kiinnittää erilaisia vasta-aineita yhden ainoan liposomin pinnalle, ja siten analyysi voi olla spesifinen kullekin monista erilaisista kohteista. Liposomien erottaminen aikaansaadaan edullisesti näkyvän tai koneella luettavan tunnusomaisen merkkiaineen avulla, joka koteloidaan liposomien sisälle tai yhdistetään fosfolipidikaksoiskerrokseen. Tunnusomaisen merkkiaine voi olla näkyvä väriaine; koneella luettava väriaine; radioaktiivinen säteilijä tai vastaava.

Liposomit ovat mikroskooppisia, pallomaisia keino-tekoisia rakenteita, jotka koostuvat pääasiallisesti fosfolipideistä. Liposomi voi koostua yhdestä tai useammasta lamellifosfolipidivesikkelistä, jotka muodostavat suljetun pallomaisen kuoren, joka voi olla kuormattu tai täytetty sellaisella aineella kuin neste tai vastaava. Koska liposomien koko on väliltä 150 - 250 nm ja lipidikalvon keskimääräinen paksuus on 2,5 nm, on ilmeistä, että liposomin tiheyden määrää pääasiallisesti koteloidun aineen, s.o. väriaineen tai merkkiaineen ja puskuriliuoksen tai kantaja-aineen tiheys. Menetelmiä liposomien valmistamiseksi ja käyttämiseksi on esitellyt julkaisussa "Liposomes: Diagnostic and Therapeutic Applications" James O'Connell lehden Medical Device and Diagnostic Industry joulukuun 1988 numerossa sivuilla 31 - 36.

Tämä keksintö koskee erityisesti valmistettujen liposomien käyttöä näytteen erilaisten aineosien erottamiseen ja esiintuomiseen. Liposomit on täytetty tai kuormattu merkitsevällä tai esiintuovalla aineella kuten nesteellä, joka sisältää näkyvää tai koneella luettavaa väriainetta tai muuta havaittavissa olevaa komponenttia. Täyteaineella on ennalta määrätty ominaispaino, joka siten määrää liposomien ominaispainon. Liposomien ulkopinnassa on kiinni-

tettynä yhtä tai useampaa erilaista vasta-ainetta, jotka ovat spesifisiä erilaisille pinta-antigeeneille, joiden tiedetään esiintyvän tutkittavissa erilaissa näytteissä olevien erilaisten kohteiden pinnalla. Siten liposomit
 5 esimerkiksi voisivat olla täytettyjä fluoresoivalla nesteellä, jonka ominaispaino on 1,5, ja niihin voisi olla kiinnitetty vasta-aineita A, B, C ja D, jotka olisivat spesifisiä pinta-antigeeneille a, b, c ja d. Nämä pinta-antigeenit olisivat antigeenejä, joiden tiedetään esiinty-
 10 vän yhden tai useamman kohteen pinnalla erilaisissa näytteissä, jotka voitaisiin tutkia joko kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti. Siten yhtä ainoaa analysointiainetta voitaisiin käyttää useiden erilaisten näytteiden analysointiin, esimerkiksi seuraavalla tavalla. On myös mahdollista käyttää erilaisia liposomeja A - D, joilla kullakin
 15 on oma tiheytensä, yllä mainittujen a - d-pinta-antigeenien määrittämiseen samanaikaisesti.

Edellä olevasta yleisestä esimerkistä käy ilmi, että keksinnöllä on laajaa käyttöä lääketieteen alalla
 20 diagnosointi- ja/tai paljoudenmäärittämismenetelmiä varten. Tarvitsee ainoastaan tietää määritettävän aineosan ominaispaino ja mitä pinta-antigeenejä sillä on. Kun nämä tosiasiat tiedetään, voidaan aikaansaada liposomi aineosan merkitsemiseksi ja sen kokoamiseksi yhteen näytteessä,
 25 jossa sitä on. Käytettävät vasta-aineet voivat olla polyklonaalisia tai monoklonaalisia vasta-aineita.

Sen vuoksi tämän keksinnön eräänä tarkoituksena on tarjota parannettu menetelmä näytteen analysoimiseksi määrätyn siinä olevan kohdeaineosan suhteen.

30 Tämän keksinnön eräänä lisätarkoituksena on tarjota kuvatun mukainen menetelmä, joka voi muuttaa kohdeaineosan ominaispainoa ja myös tuoda esiin kohdeaineosat niiden tekemiseksi todettavissa oleviksi näytteessä.

Tämän keksinnön vielä eräänä tarkoituksena on tarjota
 35 jota kohdeaineosan esiintuova aine, joka voidaan tehdä

samanaikaisesti spesifiseksi monille erilaisille kohdeaineosille.

Tämän keksinnön vielä eräänä tarkoituksena on tarjota kuvatun mukainen menetelmä, joka voi kvantitatiivisesti ja/tai kvalitatiivisesti määrittää näytteessä olevat kohdeaineosat .

Nämä ja muita keksinnön tarkoituksia ja etuja selviää paremmin seuraavasta sen useiden edullisten suoritusmuotojen yksityiskohtaisesta kuvauksesta, kun tähän yhdistetään oheinen piirros, joka on kaavioesitys tämän keksinnön yhteydessä käyttöä varten modifioidusta liposomista.

Viitaten piirrookseen, siinä on esitetty yksilamel-livesikkeliliposomi, joka on merkitty yleisesti numerolla 2. Vesikkelin 2 kalvo 4 on hyvin ohut, paksuudeltaan noin 40 Å, ja kuitenkin koteloi suhteellisen suuren tilavuuden. Vesikkelin sisusta sisältää merkkiaineenestettä 6 kuten väriainetta tai vastaavaa, joka voi olla tai olla olematta dispergoitu kantajanesteeseen. Vasta-aineet 8 on kiinnitetty kalvon 4 ulkopuolelle. Esimerkkinä esitetään neljä erilaista vasta-ainetta A, B, C ja D kalvon 4 ulkopinnalla. Kuten aikaisemmin on mainittu, kuhunkin vesikkeliin voidaan haluttaessa itse asiassa kiinnittää satoja (tai tuhansia) erilaisia vasta-aineita. Vasta-aineiden uskotaan voivan liikkua vesikkelin 2 ulkopinnalla, niin ettei tarvita erityistä vesikkelin suuntausta kohdeaineosien halutun merkitsemisen aikaansaamiseksi. Huomattakoon, että koteloidun merkkiaineen 6 paljon suuremmasta osuudesta kuin kalvon 4 osuus vesikkelissä johtuen merkkiaineen 6 ja/tai sen kantaja-aineen ominaispaino määrää vesikkelin 2 ominaispainon.

Vesikkelit 2 voidaan valmistaa minkä tahansa tavanomaisen menetelmän avulla, jolloin merkkiaine 6 koteloidaan vesikkelien valmistuksen aikana, kuten on kuvattu yllä identifioidussa O'Connellin kirjallisuusviitteessä.

Szoka ja Papahadjopoulos kuvaavat useita menetelmiä vasta-
 aineiden kiinnittämiseksi liposomeihin artikkelissaan: "Li-
 posomes: Preparation and Characterization", sivut 69 - 82,
 From Physical Structure to Therapeutic Applications,
 5 Elsevier/North Holland Biomedical Press 1981. Esimerkiksi
 liposomit voidaan valmistaa koteloimalla 5 mM fluoresee-
 iinisulfonihappo-merkkiainetta liuotettuna 5 mM EDTA-pus-
 kurikantaja-aineeseen, jonka pH on 4,5. Vasta-aineita voi-
 daan kytkeä ehyisiin liposomeihin sellaisen Schiff-emäksen
 10 avulla, joka on pelkistetty neutraalissa tai emäksisessä
 pH-arvossa stabiiliksi amidiksi natriumsyaaniboorihydridi-
 menetelmän avulla, jonka ovat kuvanneet Fiddler ja Gray
 julkaisussaan Analytical Biochemistry, vol. 86, sivuilla
 716 - 724. Tässä menetelmässä käytetään sellaisten liposo-
 15 mien perjodaattihapetusta, jotka sisältävät 10 moolipro-
 senttia laktosyylikerebrosidia tai sekoitettuja aivojen
 gangliosideja. Hapetusvaihe suoritetaan joko happamissa
 (pH 5,5) tai emäksisissä (pH 8,4) olosuhteissa. pH-arvossa
 5,5 tapahtuvan perjodaattihapetuksen aika täytyy kontrol-
 20 loida huolellisesti, jotta estettäisiin perjodaattia mene-
 mästä sisälle liposomeihin. Myöhempi pelkistysvaihe nat-
 riumsyaaniboorihydridin avulla suoritetaan neutraalissa
 pH-arvossa. Vesikkelin eheys säilyy reaktion aikana, kuten
 osoittaa se seikka, että suljettua sisällystä ei vuoda
 25 liposomeista eikä sisäänsuljettuja perjodaatilla halkais-
 tavissa olevia komponentteja hapetu. Proteiinien kytkentä
 on tehokasta yllä mainitulla tekniikalla. Proteiini prote-
 iiniin -ristikytkeytyminen tai liposomien yhdistyminen
 eivät ole vakavia ongelmia yllä mainitun menetelmän ta-
 30 pauksessa.

Tätä keksintöä voidaan käyttää kokoverinäytteessä
 olevien retikulosyyttien paljouden määrittämisessä. Reti-
 kulosyytit ovat nuoria erytrosyyttejä, ja verinäytteessä
 olevien retikulosyyttien kvantitatiivista mittaamista voi-
 35 daan käyttää ruumiin veren punasolujen tuotantonopeuden

määrittämiseen. Reikulosyyttien paljouden määrittäminen on tärkeää anemian syyn määrittämisessä, ja sitä voidaan myös käyttää "kompensoidun veren menetyksen", s.o. veren punasolujen normaalin määrän, joka on läsnä ainoastaan veren punasolutuotannon epänormaalin suuren nopeuden vuoksi, läsnäolon varmistamiseen. Tällainen kompensoitu veren menetys voi olla varhainen osoitus pahanlaatuisuudesta tai muista syistä johtuvan ruoansulatuskanavan verenvuodon esiintymisestä. Retikulosyyteillä on pinta-antigeeni transferriini, johon antitransferriinivasta-aineet voivat sitoutua. Kokoverinäytteen retikulosyyttipopulaation määrä voidaan siten määrittää kiinnittämällä antitransferriinivasta-aineita sellaisten liposomien kalvoon, jotka sisältävät nestemäistä väriainetta kuten väriä tai fluoresoivaa väriainetta, jolla on erilainen ominaispaine kuin retikulosyyteillä ja kypsillä punasoluilla. Merkitsijäliposomeja sekoitetaan sitten verinäytteen kanssa tarvittava määrä kaikkien verinäytteessä olevien retikulosyyttien sitomiseksi. Seos pannaan sitten verenanalysointiputkeen, joka on S.C. Wardlaw'lle et al. myönnettyssä US-patentissa 4 027 660 esitellyn keksinnön mukainen, ja paljous määritetään siinä kuvattujen menetelmien mukaan.

Tätä keksintöä voidaan myös käyttää henkilön veressä olevien T-imusolujen ja niiden alaryhmien osoittamiseen ja paljouden määrittämiseen. T-imusolut ovat imusolujen alaryhmä, jotka ovat solusidonnaisen immuniteetin välittäjiä; ja B-imusolut ovat humoraalisen immuniteetin välittäjiä (vasta-aineen tuottajia).

Imusolujen reaktiokykyä spesifisiä veressä olevia antigeenejä kohtaan tarkastellaan US-patenttihakemuksessa 07/340 248, jonka ovat jättäneet 19. huhtikuuta 1989 Robert A. Levine ja Stephen C. Wardlaw. Aktivoiduilla imusoluilla (lymfoblasteilla) on pinta-aktivaatioantigeenejä kuten transferriinin reseptori; HLA-Dr; Leu-23 ja vastaavia. Lymfoblastien osoittamiseksi vasta-aineita, jotka

ovat spesifisiä jollekin yllä mainituista imusolujen anti-geeneistä, kiinnitetään liposomeihin, joihin on sisällytetty sopivaa merkkiainetta. Merkitsijäliposomeja sekoitetaan sitten verinäytteen kanssa sopivan ajan verran, jotta

5 sallittaisiin liposomien sitoutua kaikkiin lymfoblasteihin, jotka voivat olla läsnä verinäytteessä. Seos siirretään sitten verenanalysointiputkeen, joka on US-patentissa 4 027 660 esiteltyä tyyppiä, ja tutkitaan siinä kuvattujen menetelmien mukaan.

10 Koska tutkittavat solut ovat valkosoluja, valitaan edullisesti sellainen merkkiväriaine, että sillä on erilainen ominaispaino kuin valkosoluilla, jotta saadaan mahdolliset merkityt lymfoblastit kerrostumaan erilleen muista valkosoluista tai paikalliseksi vyöhykkeeksi valkosolujen joukkoon. Liposomien, joita käytetään T-imusoluja koskevassa imusolualaryhmän valinnassa, tiheys on pienempi kuin 1,017 g/ml. Imusolujen keskimääräinen tiheys on 1,06 g/ml ja tiheysalue 1,055 - 1,070 g/ml. Sen vuoksi käytettävät liposomit kykenevät pienentämään kohteena olevien

15 20 T-imusolujen tiheyden saaden ne nousemaan imusolukerroksen päälle.

Seuraava on esimerkki keksinnön käytöstä verinäytteessä olevien T-imusolujen osoittamiseen. Merkkiaineseos, joka käsitti 25 µl laimentamatonta 55-2/LEU-1-vasta-ainetta

25 kytkettynä liposomeihin, jotka oli täytetty fluoreseini (fluoresoiva) -väriaineella, jonka ominaispaino oli pienempi kuin 1,017 g/ml, lisättiin 1 ml:aan EDTA-laskimoverta ja tähän seokseen lisättiin 25 µl laimentamatonta pitoisuuden 0,42 g/10 ml omaavaa natriumfluoridin kantaliuosta. Natriumfluoridi tuottaa imusoluvyöhykkeiden fluo-

30 resoimattomien ja fluoresoivien komponenttien terävemmän erottumisen. Yllä mainittuun seokseen lisättiin 50 µl laimentamatonta pitoisuuden 1,1 g/10 ml omaavaa kaliumoksa-

35 vässolu-erotus kuten on kuvattu alan aikaisemmassa julkai-

- sussa, johon on viitattu ensimmäiseksi yllä. Tulokseksi saatua seosta inkuboitiin viiden minuutin ajan, minkä jälkeen seos sentrifugoitiin eri solutyypin erottamiseksi kapillaarissa tai muussa läpinäkyvässä putkessa, joka sisälsi muovikellukeainetta, joka laajentaa näytteessä olevia eri soluja. Yllä mainittua tekniikkaa käytettäessä fluoresoivien imusolujen erillinen vyöhyke muodostui valkosolukerrokseen. Tämän vyöhykkeen määrä määritettiin mitaamalla sen aksiaalinen ulottuvuus putkessa. Tulokseksi saatu arvo oli osoitus veressä olevista kiertävistä T-imusoluista. Kun käytetään väriaineita tai merkkiaineita, joilla on erilainen ominaispaine, merkityt solut voidaan saada sedimentoitumaan muualle sentrifugoidussa verinäytteessä.
- 15 Keksintöä voidaan käyttää myös biologisten nesteiden näytteissä olevien muiden solujen, hiukkasten tai organismien määrittämiseen. Epänormaalien määrien beeta-amyloidi-proteiinia (BAP) läsnäoloa tiedetään esiintyvän sellaistaisten potilaiden aivoissa, ihossa ja paksusuolen limakalvossa, jotka kärsivät Alzheimerin taudista, rappeuttavasta hermoston sairaudesta, ja vanhemmilla potilailla, joilla on Downin syndrooma, synnynnäinen häiriö, joka tunnetaan myös trisomia 21:nä. BAP ei ole ollut osoitettavissa seerumista tähän mennessä. BAP:n läsnäolo imusolutyyppejä tai muita tyyppejä olevissa veren valkosoluissa voidaan osoittaa käyttämällä liposomeihin kiinnitettyjä vasta-aineita, jotka on suunnattu BAP:ssa olevia pinta-antigeenejä vastaan, joita antigeenjä on esillä BAP:a tuottavien kiertävien solujen pinnalla.
- 25 Mitä tulee organismien osoittamiseen biologisten nesteiden näytteistä, malariaan liittyvät alkueläimet ovat yleensä solunsisäisiä organismeja, jotka osoitetaan veren punasoluissa immunologisten keinojen avulla, sillä vastaaineet eivät kykene tunkeutumaan veren punasolujen solukalvon läpi ehyissä elävissä soluissa. Falciparum-tyyppejä

- olevat malariaan liittyvät alkueläimet tuottavat tunnusomaisia veren punasolun muutoksia infektoiduissa veren punasoluissa. Olisi elintärkeää erottaa falciparum-malaria ei-falciparum-malriasta, koska edellinen on usein kohtalo-
- 5 kas ja usein vastustuskykyinen yleisesti käytettyjä malarialääkkeitä kohtaan. Ei-asiantuntijoiden on vaikea morfologisesti erottaa toisistaan falciparum-malaria ja ei-falciparum-malaria. Sellaisten merkitsijäliposomien käyttäminen, jotka kykenevät sitoutumaan falciparum-malarialla
- 10 infektoituihin punasoluihin, tekisi ammatti-ihmiselle mahdolliseksi identifioida infektio. Liposomien pinnalla olevat vasta-aineet ovat spesifisiä punasolukalvon pinta-antigeenille, jota on ainoastaan falciparumin infektoimilla punasoluilla.
- 15 Koska voidaan tehdä monia keksinnön esitellyn suoritussuunnan muutoksia ja muunnoksia poikkeamatta keksinnön ajatuksesta, ei ole tarkoitus rajoittaa keksintöä muuten kuin kuten oheiset patenttivaatimukset vaativat.

Patenttivaatimukset:

1. Ominaispainoa muuttava merkitsijähiukkanen käytettäväksi analysoitaessa biologisen nesteen näytettä kohdekomponentin läsnäolon määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että hiukkanen käsittää:

- a) liposomivesikkelin;
- b) vasta-aineen kiinnitettynä mainitun vesikkelin ulkopinnalle, joka vasta-aine on spesifinen mainitun kohdekomponentin pinnalla olevalle pinta-antigeenille; ja
- c) merkkiaineen sisällytettynä mainittuun vesikkeliin, joka merkkiaine tekee mainitun vesikkelin todettavissa olevaksi biologisen nesteen näytteessä ja joka merkkiaine ja/tai sen kantaja-aine antavat mainitulle vesikkelille ominaispainon, joka on erilainen kuin mainitun kohdekomponentin ominaispaino.

2. Ominaispainoa muuttava merkitsijähiukkanen käytettäväksi analysoitaessa biologisen nesteen näytettä sellaisen kohdekomponentin määrittämiseksi, joka on valittu useita kohdekomponentteja käsittävästä ryhmästä, t u n n e t t u siitä, että hiukkanen käsittää

- a) liposomivesikkelin;
- b) vähintään kaksi erilaista vasta-ainetta kiinnitettynä mainitun vesikkelin ulkopinnalle, jolloin kukin mainituista erilaisista vasta-aineista on spesifinen erilaiselle mainittujen kohdekomponenttien pinnalla olevalle pinta-antigeenille; ja
- c) merkkiaineen sisällytettynä mainittuun vesikkeliin, joka merkkiaine tekee mainitun vesikkelin todettavissa olevaksi biologisen nesteen näytteessä ja joka merkkiaine antaa mainitulle vesikkelille ominaispainon, joka on erilainen kuin mainittujen kohdekomponenttien ominaispaino.

3. Monia ominaispainoa muuttavia merkitsijähiukkasia käytettäväksi analysoitaessa biologisen nesteen näy-

tettä monien kohdekomponenttien läsnäolon määrittämiseksi, t u n n e t t u j a siitä, että hiukkaset käsittävät:

- a) ryhmän ensimmäisiä liposomivesikkeleitä, jolloin kussakin mainituista ensimmäisistä vesikkeleistä on ensimmäistä vasta-ainetta kiinnitettynä näiden ensimmäisten vesikkeliien ulkopinnalle, joka mainittu ensimmäinen vasta-aine on spesifinen yhden mainituista monista kohdekomponenteista pinnalla olevalle pinta-antigeenille; ja ensimmäistä merkkiainetta sisällytettynä mainittuihin ensimmäisiin vesikkeleihin, joka ensimmäinen merkkiaine tekee mainitut ensimmäiset vesikkelit todettavissa oleviksi biologisen nesteen näytteessä ja joka mainittu ensimmäinen merkkiaine antaa mainituille ensimmäisille vesikkeleille ensimmäisen ominaispainon, joka on erilainen kuin mainitun yhden mainituista kohdekomponenteista ominaispaino; ja
- b) ryhmän toisia liposomivesikkeleitä, jolloin kussakin mainituista toisista vesikkeleistä on toista vasta-ainetta kiinnitettynä näiden toisten vesikkeliien ulkopinnalle, joka mainittu toinen vasta-aine on spesifinen toisen mainituista monista kohdekomponenteista pinnalla olevalle pinta-antigeenille; ja toista merkkiainetta sisällytettynä mainittuihin toisiin vesikkeleihin, joka mainittu toinen merkkiaine tekee mainitut toiset vesikkelit todettavissa oleviksi biologisen nesteen näytteessä ja joka mainittu toinen merkkiaine antaa mainituille toisille vesikkeleille toisen ominaispainon, joka on erilainen kuin mainitun toisen mainituista kohdekomponenteista ominaispaino ja on myös erilainen kuin mainittu ensimmäinen ominaispaino.

4. Menetelmä biologisen nesteen näytteen analysoimiseksi kohdekomponentin läsnäolon näytteessä määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

- a) hankitaan suuri määrä liposomivesikkeleitä, joiden ulkopinnalle on kiinnitetty vasta-ainetta, joka on spesifinen mainitun kohdekomponentin pinnalla olevalle pinta-an-

- tigeenille; joihin mainittuihin vesikkeleihin on sisällytetty merkkiainetta ja/tai kantaja-ainetta, joka tekee mainitut vesikkelit todettavissa oleviksi biologisen nesteen näytteessä ja joka mainittu merkkiaine ja/tai kantaja-
- 5 aine antaa mainituille vesikkeleille ominaispainon, joka on erilainen kuin mainitun kohdekomponentin ominaispaino;
- b) lisätään mainittuja vesikkeleitä nesteen näytteeseen niiden seoksen muodostamiseksi;
- c) sentrifugoidaan seos kaikkien liposomi-kohdeyhdistelmien erottamiseksi gravimetrisesti erilliseksi vyöhykkeeksi seoksessa ja
- 10 d) identifioidaan mainittu erillinen vyöhyke ja/tai määritetään sen paljous sentrifugoidussa seoksessa.

5. Menetelmä biologisen nesteen näytteen analysoimiseksi vähintään kahden kohdekomponentin läsnäolon näytteessä määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

15

- a) hankitaan suuri määrä ensimmäisiä liposomivesikkeleitä, joiden ulkopinnalle on kiinnitetty ensimmäistä vasta-
- 20 ainetta, joka on spesifinen yhden mainituista kohdekomponenteista pinnalla olevalle pinta-antigeenille; joihin mainittuihin ensimmäisiin vesikkeleihin on sisällytetty ensimmäistä merkkiainetta, joka tekee mainitut ensimmäiset vesikkelit todettavissa oleviksi biologisen nesteen näyt-
- 25 teessä ja joka mainittu ensimmäinen merkkiaine antaa mainituille ensimmäisille vesikkeleille ensimmäisen ominaispainon, joka on erilainen kuin mainitun yhden mainituista kohdekomponenteista ominaispaino;
- b) hankitaan suuri määrä toisia liposomivesikkeleitä, joiden ulkopinnalle on kiinnitetty toista vasta-ainetta, joka
- 30 toinen vasta-aine on spesifinen toisen mainituista kohdekomponenteista pinnalla olevalle pinta-antigeenille; joihin mainittuihin toisiin vesikkeleihin on sisällytetty toista merkkiainetta, joka tekee mainitut toiset vesikke-
- 35 lit todettavissa oleviksi biologisen nesteen näytteessä ja

- joka toinen merkkiaine antaa mainituille toisille vesikkeleille ominaispainon, joka on erilainen kuin mainitun toisen mainituista kohdekomponenteista ominaispaino ja joka on myös erilainen kuin mainittu ensimmäinen ominaispaino;
- 5 c) lisätään mainittuja vesikkeleitä nesteen näytteeseen niiden seoksen muodostamiseksi;
- d) sentrifugoidaan seos kaikkien liposomi-kohdeyhdistelmien erottamiseksi gravimetrisesti erillisiksi vyöhykkeiksi seoksessa ja
- 10 e) identifioidaan mainitut erilliset vyöhykkeet ja/tai määritetään niiden paljous sentrifugoidussa seoksessa.

6. Menetelmä verinäytteen analysoimiseksi BAP:n läsnäolon näytteessä määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

- 15 a) hankitaan suuri määrä liposomivesikkeleitä, joiden ulkopinnalle on kiinnitetty vasta-ainetta, joka on spesifinen BAP:a tuottavien verisolujen pinnalla olevalle pinta-antigeenille; joihin mainittuihin vesikkeleihin on sisällytetty merkkiainetta, joka tekee mainitut vesikkelit todettavissa oleviksi verinäytteessä ja joka merkkiaine antaa mainituille vesikkeleille ominaispainon, joka on erilainen kuin mainittujen BAP:a tuottavien solujen ominaispaino;
- 20 b) lisätään mainittuja vesikkeleitä verinäytteeseen niiden seoksen muodostamiseksi;
- 25 c) sentrifugoidaan seos kaikkien liposomi-verisoluyhdistelmien erottamiseksi gravimetrisesti erilliseksi vyöhykkeeksi seoksessa ja
- d) identifioidaan mainittu erillinen vyöhyke ja/tai määritetään sen paljous sentrifugoidussa seoksessa.
- 30

7. Menetelmä verinäytteen analysoimiseksi falciparum-malaria-alkueläinten läsnäolon näytteessä määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

- a) hankitaan suuri määrä liposomivesikkeleitä, joiden ulkopintaan on kiinnitetty vasta-ainetta, joka on spesifinen mainittujen alkueläinten infektoimien veren punasolujen pinnalla olevalle pinta-antigeenille; joihin mainittuihin vesikkeleihin on sisällytetty merkkiainetta, joka tekee mainitut vesikkelit todettavissa oleviksi näytteessä ja joka merkkiaine antaa mainituille vesikkeleille ominaispainon, joka on erilainen kuin mainittujen alkueläinten ominaispaino;
- b) lisätään mainittuja vesikkeleitä näytteeseen niiden seoksen muodostamiseksi;
- c) sentrifugoidaan seos kaikkien liposomi-alkueläinyhdistelmien erottamiseksi gravimetrisesti erilliseksi vyöhykkeeksi seoksessa ja
- d) identifioidaan mainittu erillinen vyöhyke ja/tai määritetään sen paljous sentrifugoidussa seoksessa.
8. Menetelmä verinäytteen analysoimiseksi T-imusolujen tai niiden alaryhmien läsnäolon näytteessä määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:
- a) hankitaan suuri määrä liposomivesikkeleitä, joiden ulkopintaan on kiinnitetty vasta-ainetta, joka on spesifinen mainittujen T-imusolujen tai alaryhmien pinnalla olevalle pinta-antigeenille; joihin mainittuihin vesikkeleihin on sisällytetty merkkiainetta, joka tekee mainitut vesikkelit todettavissa oleviksi näytteessä ja joka mainittu merkkiaine antaa mainituille vesikkeleille ominaispainon, joka on erilainen kuin mainittujen T-imusolujen tai alaryhmien ominaispaino;
- b) lisätään mainittuja vesikkeleitä näytteeseen niiden seoksen muodostamiseksi;
- c) sentrifugoidaan seos kaikkien liposomi-T-imusolu- tai -alaryhmäyhdistelmien erottamiseksi gravimetrisesti erilliseksi vyöhykkeeksi seoksessa ja
- d) identifioidaan mainittu erillinen vyöhyke ja/tai määritetään sen paljous sentrifugoidussa seoksessa.

