

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 871982 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 871982

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12Q 1/56
C12N 5/00
G01N 33/531

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 05.05.1987

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 05.05.1987

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 07.11.1987

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

06.05.1986 US 860169 23.06.1986 US 877609

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Epitope, Inc., 15425-E S.W. Koll Parkway Beaverton, Oregon, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Burger, Denis R., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Goldstein, Andrew S., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Menetelmä AIDS-viruksen infektiota toteuttamiseksi.

Förfarande för påvisning av AIDS-virusinfektion.

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

HB9100 ATCC
HB9115 ATCC

HB9101 ATCC

HB9102 ATCC

HB9114 ATCC

Menetelmä AIDS-viruksen infektion toteamiseksi

Immuunikadoksi (AIDSiksi) kutsuttu sairaus on havaittu vasta vähän aikaa sitten, mutta se on synnyttänyt hälyttävän tilanteen monissa osissa maailmaa. Diagnostoitujen tapausten lukumäärä vuotta kohden on kasvanut nopeasti, ja tuloksena on ollut suuri määrä kuolemantapauksia. Viime aikoihin asti sairautta on ilmeisesti esiintynyt pääasiassa homoseksuaalisilla miehillä, joilla on ollut useita seksikumppaneita, laskimonsisäisten huumeiden käyttäjillä, hemofiilikoilla, verensiirron saajilla ja edellisen ryhmän jäsenen kanssa läheisessä heteroseksuaalisessa kosketuksessa olijoilla. Huolimatta AIDSin aiheuttamasta kasvavasta huolesta, on tämän sairauden alkuperä ja hoito edelleen ratkaisematta lääketieteellisessä ja tieteellisessä yhteisössä, vaikka tämän sairauden parissa on jo tehty suuri määrä tutkimustyötä.

Tärkein edistysaskel ja AIDSin taustaa valaiseva tieto on ollut uuden retrovirusryhmän eristäminen potilaista, jotka sairastavat AIDSia tai ARC:tä (AIDSiin liittyvää oireyhtymää). Tätä virusryhmää kutsutaan vaihtelevasti LAV:ksi (lymphadenopathy virus, imusolmuketautivirus) [S. Wain Hobson et al., Cell 40 (1978) 9-17], HTLV-III:ksi (human T lymphotropic virus III) [L. Ratner et al., Nature 313 (1985) 277-84] ja ARV:ksi (AIDS-associated retrovirus, AIDSiin liittyvä retrovirus) [R. Sanchez Pescador et al., Science 227 (1985) 484-492]. Morfologiselta ja biologiselta kannalta katsottuna tämä virusryhmä on kaikkein läheisintä sukua lentiviruksille.

AIDS-viruksen pääkohteina ihmiselimistössä ovat tietyt T-solualapopulaatiot. Näiden potilaiden vakava immuunikato on seurausta T-solujen (T4) epätavallisen pienestä osuudesta heidän lymfosyyttipopulaatiossaan. Tämän seurauksena vähenee monien T4-auttajasolutoiminto-

jen saatavuus. Eräs tällainen toiminto on B-solujen vasta-ainetuotanto.

AIDS-potilaissa ilmenevä huomattava soluimmunitettiin heikkeneminen ja kvantitatiiviset muutokset heidän
 5 T-lymfosyyttialapopulaatioissaan viittaavat siihen, että T-solut tai jokin T-solualaryhmä saattaisivat olla oletetun infektionaiheuttajan ensisijaisena kohteena. Nämä muutokset voivat vaihtoehtoisesti olla myöhempien infektioiden aiheuttamia. Alentunut soluimmunitaatti saattaa
 10 johtaa vakaviin opportunistisiin infektioihin AIDS-potilaissa, joista monille kehittyy Kaposin sarkooma. Myös multippeleja lymfadenopatioita on kuvattu homoseksuaalisilla miehillä ja lapsilla, joille saattaa kehittyä tai olla kehittymättä AIDS. Imusolmukesairaudet saattavat
 15 vastata sairauden varhaista tai lievähköä muotoa.

Tällä hetkellä käytetään pääasiassa kolmea testiä HTLV-III-virukselle spesifisen seerumivasta-aineen läsnäolon toteamiseksi. Eniten käytetty menettely on ELISA-määritys, jossa käytetään joko syvennyksiä tai helmiä,
 20 jotka on päällystetty HTLV-III-viruslysaatilla. Seropositiivisen näytteen spesifinen vasta-aine sitoutuu anti-geenilla päällystettyyn pintaan, johon kiinnitetään sitten entsyymiin kytketty anti-ihmisvasta-aine ja asianmukainen kromogeeninen substraatti.

Toinen vasta-aineen osoitusmenettely, jota käytetään useammiten ELISA-määrityksen varmistustestinä, on Western Blot-menetelmä (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot). HTLV-III-virus-lysaatti jaetaan SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin (SDS-PAGE) avulla
 30 joukoksi vyöhykkeitä, joista kukin vastaa tiettyä virusgenomin tuotetta. Antigeenivyöhykkeet siirretään sitten täpliksi nitroselluloosakalvolle käytettäväksi entsyymikytketty immuunisorbentti-määrityksessä, joka on samankaltainen kuin edellä mainittu ELISA. Western Blot-menetelmän pääetuna on virusantigeenien erottuminen erillisik-
 35

si vyöhykkeiksi, mikä saa aikaan paljon paremman spesifisyyden. Western Blot-menetelmässä tulee näkyviin kaksi vyöhykettä, joista jompaa kumpaa tai molempia pidetään osoituksena HTLV-III:lle spesifisestä vasta-aineesta testin ELISA-osassa detektoituina. Ensimmäinen vyöhyke on 24 000 daltonin ydinproteiini. Toinen vyöhyke on 41 000 daltonin glykoproteiini, joka muodostaa osan viruksen vaipasta. ELISA-määrittelyssä saadut epäselvät tulokset tutkitaan usein uudelleen tekemällä Western Blot-erotus. Myös positiiviset tulokset (erityisesti yksilöillä, jotka kuuluvat alhaisen riskin ryhmään) osoittautuvat usein negatiivisiksi tutkittaessa ne uudelleen Western Blot-menetelmällä.

Kolmas vasta-ainetestti on epäsuora immuunifluoresenssimäärittely, jossa käytetään viruksen infektoimia imusoluja, joiden annetaan ensin reagoida potilaan seerumin ja sitten fluorokromiseen aineeseen kytketyn anti-ihmisen vasta-aineen kanssa. Infektoitujen solujen fluoresenssi merkitsee positiivista tulosta. Infektoitumattomat imusolut toimivat negatiivisena vertailunäytteenä, joka tunnistaisi soluille, mutta ei virukselle, spesifisen vasta-aineen.

ELISA-määrittelyn ja Western Blot-varmistustestien käyttö HTLV-III-vasta-aineen toteamiseen on ollut arvokas seulontakeino kontaminoituneiden verituotteiden eliminoimiseksi kansallisista verivarastoista samoin kuin infektoivien elinten- ja spermanluovuttajien detektoimiseksi. HTLV-III-virukselle spesifisen seerumivasta-aineen osoittaminen ei kuitenkaan merkitse AIDS-diagnoosia. Seropositiivisuus ei osoita sitä, että potilas on ollut alttiina elävälle virukselle, että hän on infektoiva tai kantaa aktiivisesti kasvavaa virusta, eikä se anna viitteitä sairauden kulusta. Merkittävällä osalla seropositiivisista hemofiilikoista ei ole onnistuttu osoittamaan viruksen läsnäoloa veressä nykyisillä mene-

telmillä. Nämä yksilöt ovat otaksuttavasti joutuneet
alttiiksi lämpökäsiteltyjen tekijä VIII-valmisteiden
sisältämälle inaktivoituneelle virukselle. Joillakin
seropositiivisilla yksilöillä korrelaatio spesifisen
5 vasta-aineen esiintymisen ja HTLV-III-viruksen vilje-
lyn onnistumisen välillä on voimakas.

Käytännölliset menettelyt, joilla voidaan detek-
toida HTLV-III-virusinfektioon liittyvien antigeenien
läsnaolo ihmiselimistönesteissä, ovat oleellisia luo-
tettavan diagnostisen AIDS-testin aikaansaamiseksi sa-
10 moin kuin keinojen saamiseksi kokeellisten lääkkeiden,
joiden tehoa AIDSin uhrien hoidossa parhaillaan tutki-
taan, vaikutusten arviointiin.

Nykyisin tärkeimmässä menetelmässä HTLV-III-vi-
15 ruksen osoittamiseksi verestä sekoitetaan potilaan lym-
fosyyttejä fytohemagglutiniinilla (PHA:lla) stimuloitui-
hin ääreisverilymfosyytteihin (PBL:iin) lisäten tuoreita
PHA-stimuloituja PBL:iä joka kolmas päivä. Superna-
tanttinäytteistä tutkitaan sitten kolmen päivän välein
20 käänteistransskriptaasin läsnäolo. Soluista arvioidaan
elektronimikroskopian avulla viruksen läsnäolo. Tämä me-
netelmä rajoittuu selvästikin korkean tason laitoksiin,
joissa on P3-varustus samoin kuin mahdollisuus tehdä
pitkälle kehitettyjä kudosviljelyjä ja analyysyjä. Tulos-
25 ten saaminen saattaa viedä muutamia viikkoja, ja lymfo-
syyttiviljelmien virusinfektioonin luotettavuus on ky-
seenalaista. Nimellä H9 tunnetun solulinjan käytöstä on
ollut jonkin verran apua, mutta useimmat edellä maini-
tuista ongelmista ovat edelleen olemassa.

30 Alalla tunnetaan tiettyjä diagnostisia menetelmiä
AIDSin tai AIDS-vasta-aineiden läsnäolon määrittämiseksi.
Eräs tällainen menetelmä on T-soluilla ja T-solualapopu-
laatioilla tehtävä auttajavaimentajasoluanalyysi. Autta-
ja- ja vaimentajasolujen välisen suhteen muuttumista pi-
35 detään osoituksena AIDS-viruksen mahdollisesta läsnäolos-

ta. Tämän määrittelyn spesifisyys ja herkkyys on heikko. Eräässä toisessa menetelmässä mitataan tymosiinitaso; tason kohoaminen on osoitus AIDSin läsnäolosta. Tällä menetelmällä saadaan positiivisia tuloksia vasta sairau-
 5 rauden kehityttyä pitkälle. Lisäksi on raportoitu, että tällä menetelmällä ei saada yhtäpitävästi positiivisia arvoja kaikissa tapauksissa, joissa AIDSin tiedetään olevan läsnä. AIDSin diagnosointia nisäkäskohteista käyttämällä immuunisytoadherentteja (rosetti-inhibitio-
 10 menetelmä) kuvataan EP-hakemusjulkaisussa nro 0 154 499. US-patenttijulkaisussa nro 4 520 113 kuvataan HTLV-III-vasta-aineiden serologista detektointia AIDSia tai sen esiasteita sairastavien potilaiden seerumista. Julkai-
 15 sussa Nature 318 (1985) 465-467 kuvataan ihmisen T-solujen auttajasoluja indusoivaan toimintaan liittyvää myöhäistä erilaistumisantigeenia. AIDSin tai lymfadenopatiaoireiston diagnosointia käyttämällä määrättyä T-lymfotrooppisen retroviruksen antigeenia käsitellään EP-hakemusjulkaisussa 0 138 667.

20 Tämä keksintö koskee menetelmää HTLV-III:lla infektoituneiden solujen osoittamiseksi väliaineesta, kuten elimistön nesteestä tai kasvualustasta. Menetelmässä saatetaan väliaine kosketukseen infektion seurauksena syntyneen antigeenin vastaisen monoklonaalisen vasta-
 25 aineen kanssa, ja detektoidaan vasta-aineiden sitoutuminen antigeeniin. Antigeeni voi olla HTLV-III-viruksen geenituote, tai se voi olla sidottuna tällaiseen tuotteeseen. Vaihtoehtoisesti voi antigeenia syntyä infektion seurauksena ja esiintyä lymfosyytillä, kuten T-auttajasolulla.

30 Keksintö koskee lisäksi immuunimääritysmenetelmää AIDS-virukseen liittyvän infektion osoittamiseksi isännässä. Menetelmässä yhdistetään isännästä saatu elimistön neste monoklonaaliseen vasta-aineeseen, joka sitoutuu antigeeniin, jota on läsnä vain AIDS-infektion yh-
 35

teydessä, ja tutkitaan yhdistelmästä antigeenista ja monoklonaalisesta vasta-aineesta koostuvien immuunikompleksien läsnäolo.

Keksintö koskee myös vasta-ainetta, jolla on kyky sitoutua seerumiantigeeniin, jota muodostuu ihmisen HTLV-virusinfektion seurauksena. Antigeeni voi olla HTLV-III-viruksen geenituote tai sitoutuneena HTLV-III-viruksen geenituotteeseen. Vaihtoehtoisesti antigeeni voi olla sitoutuneena lymfosyyttiin HTLV-III-virusinfektion seurauksena. Keksinnön piiriin kuuluvat myös jatkuvat hybridisolulinjat, joille on tunnusmerkillistä se, että ne tuottavat keksinnön mukaisia vasta-aineita.

Keksintö koskee myös diagnostisia välineistöjä, jotka sisältävät pakatussa yhdistelmässä monoklonaalista vasta-ainetta, jolla on kyky sitoutua antigeeniin, jota muodostuu AIDS-virusinfektion seurauksena, tai tällaisen vasta-aineen leimattua johdosta.

Keksinnön eräs puoli koskee menetelmää HTLV-III-virusinfektion osoittamiseksi varhaisvaiheessa soluviljelmissä. Menetelmässä yhdistetään HTLV-III-viruksella infektoituneiksi epäiltyjä soluja keksinnön mukaiseen monoklonaaliseen vasta-aineeseen. Vasta-aineen ja antigeenin välisen sitoutumisen toteaminen on osoitus HTLV-III-virusinfektion läsnäolosta soluviljelmässä.

Keksinnön piiriin kuuluvat myös ainekoostumukset, jotka sisältävät yhdistelmää, joka koostuu
(a) monoklonaalisesta vasta-aineesta, joka sitoutuu HTLV-III-geenituotteeseen tai sen johdokseen, ja
(b) tällaisesta geenituotteesta tai johdoksesta.

Eräs toinen tämän keksinnön mukainen ainekoostumus sisältää yhdistelmää, joka koostuu

(a) monoklonaalisesta vasta-aineesta, jolla on kyky sitoutua soluun sitoutuneeseen antigeeniin, joka on muu kuin HTLV-III-geenituote ja jota syntyy HTLV-III-infektion seurauksena, ja
(b) tällaista antigeenia.

Ennen tämän keksinnön erityissuoritusmuotojen tarkempaa kuvaamista määritellään joukko termejä.

"AIDS-virus" tarkoittaa HTLV-III:a, ARV:tä, LAV:tä ja niiden sukulaisviruksia, joiden tiedetään aiheuttavan tai epäillänsä aiheuttavan AIDSia, ARC:tä, LAD:tä ja niiden kaltaisia häiriöitä.

"AIDSiin liittyvä sairaus" tarkoittaa sairautta, joka on AIDS, AIDSiin liittyvä oireyhtymä (ARC), lymfadenopatia (LAD), etenevä yleislymfadenopatia (PGL) tai niiden sukulaissairaus, jonka tiedetään tai epäillänsä aiheutuvan AIDS-virusinfektiosta.

"Liukoinen AIDS-antigeeni" tarkoittaa AIDS-virusinfektion seurauksena muodostuvaa antigeenia, joka ei ole sitoutuneena solukalvoon ja jota esiintyy tyypillisesti ihmisissä, jotka ovat AIDS-viruksen infektoimia.

"Soluun sitoutunut AIDS-antigeeni" tarkoittaa solukalvoon sitoutunutta antigeenia, jota esiintyy tyypillisesti ihmisissä, jotka ovat AIDS-viruksen infektoimia.

"Elimiston neste" tarkoittaa nestemäistä tai puolikiinteätä materiaalia, jota saadaan nisäkäskohteen elimistöstä. Nestemäinen materiaali voi olla steriiliä tai epästeriiliä, ja se sisältää usein soluja. Nestemäinen materiaali voidaan käyttää ilman jatkokäsittelyä, tai se voidaan käsitellä solujen, solujätteiden tms poistamiseksi. Esimerkkejä elimistön nesteistä ovat kokoveri, immuneste, seerumi, plasma, sylki, siemenneste ja selkäydinneste. Elimistön neste voidaan poistaa kohteesta esimerkiksi ruiskun tai neulan avulla tai luonnollisen erittymisen kautta.

"Solu" tarkoittaa yksisoluisia organismeja, kuten bakteeria, sekä myös elimistön nesteestä saatuja normaleja ja transformoituja soluja, tavallisesti nisäkässoluja. Solut voivat olla infektoituneita tai infektoitumattomia ja viljeltyjä tai viljelemättömiä.

"Lymfosyytti" tarkoittaa erilaisia veren valkoso-

luja tai soluja, joita syntyy imurauhasten ja imusolmukkeiden verkkokudoksessa. Solut ovat yksitumaisia, ja tumaa ympäröi protoplasma, jota yleensä kuvataan ei-granulaariseksi. On olemassa pieniä lymfosyyttejä, jotka ovat
 5 suunnilleen punasolujen kokoisia, ja suuria lymfosyyttejä, jotka ovat todennäköisesti kehittyvässä vaiheessa olevia lymfosyyttejä, kaksi tai kolme kertaa niin suuria kuin pienet lymfosyytit ja sisältävät enemmän protoplasmaa.

"T-lymfosyytti" tarkoittaa kateenkorvasta lähtöisin olevia lymfosyyttejä. T-solujen päätehtävänä on säädellä B-solujen immuunivastetta auttaja- ja vaimentajatoimintojen kautta. T-solut eivät valmista tavanomaisia vasta-aineita ja eroavat siten vasta-aineita muodostavista soluista, joita syntyy luuytimessä ja joista käytetään
 10 nimitystä B-lymfosyytit.

"T-auttajasolu" tarkoittaa T-lymfosyyttiä, jonka päätehtävänä on säädellä B-solujen immuunivastetta auttavalla, eikä vaimentavalla, tavalla.

"Virusgeenituote" tarkoittaa tuotetta, kuten anti-
 20 geenia, jota syntyy AIDSiin liittyvästä viruksesta RNA:n tai DNA:n replikaation kautta.

Tämä keksintö koskee menetelmää AIDSiin liittyvän viruksen, kuten HTLV-III:n, infektioiden solujen läsnäolon osoittamiseksi väliaineesta. Menetelmässä saatetaan
 25 väliaine kosketukseen infektion seurauksena syntyneen antigeenin vastaisten monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa, ja detektoidaan vasta-aineiden sitoutuminen antigeeniin. Jos tapahtuu sitoutumista antigeenin ja vasta-aineiden välillä, on osoitettu väliaineessa olevien solujen infektoituminen AIDSiin liittyvällä viruksella. Väliaine voi olla esimerkiksi elimistön neste tai kasvu-
 30 alusta. Antigeeni voi olla liukoinen antigeeni tai soluun sitoutunut antigeeni. Antigeeni voi lisäksi olla virusgeenituote tai sitoutunut virusgeenituotteeseen. Kun antigeeni ei ole virusgeenituote, sitä syntyy seurauksena
 35

solujen infektoitumisesta AIDSiin liittyvällä viruksella. Antigeeni voi olla sitoutuneena lymfosyyttiin, kuten esimerkiksi T-auttajasoluun, tai makrofagiin. Kun antigeeni on virusgeenituote, menetelmässä tavallisesti detektoidaan vasta-aineiden sitoutuminen infektoituneisiin soluihin.

Keksinnön piiriin kuuluvalla vasta-aineella on kyky sitoutua seerumiantigeeniin, jota syntyy seurauksena HTLV-III-virusinfektioista. Antigeeni on HTLV-III-viruksen geenituote tai sitoutuneena HTLV-III-viruksen geenituotteeseen. Antigeeni voi vaihtoehtoisesti olla sitoutuneena lymfosyyttiin, ja sitä syntyy HTLV-III-infektion seurauksena. Kun antigeeni on liukoinen, se ei tavallisesti ole virusgeenituote.

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoisia monoklonaalisia vasta-aineita voidaan tuottaa Köhlerin ja Milsteinin [*Nature* 265 (1975) 495-497] tavanomaisen menetelmän mukaisesti. Immunogeenina voidaan käyttää esimerkiksi osittain puhdistettuja viruslysaatteja, joita saadaan kasvattamalla HTLV-III:a ihmisen lymfoomasolulinjassa H9. Näytteitä HTLV-III-antigeenipreparaateista injektoidaan hiireen, ja riittävän pitkän ajan kulluttua hiiri tapetaan ja otetaan talteen pernasolut. Pernasolujen kromosomeista, jotka koodaavat haluttujen immunoglobuliinien emässekvenssejä, tehdään kuolemattomia fuusioimalla pernasolut myeloomasolulinjoihin, yleensä ionittoman pinta-aktiivisen aineen, esimerkiksi polyetyleeniglykolin, läsnäollessa. Tuloksena olevien solujen, joiden joukossa on fuusioituneita hybridomia, annetaan kasvaa selektiivisessä alustassa, kuten HAT-alustassa, ja kasvatetaan elossa pysyviä soluja tällaisessa alustassa käyttämällä rajalaimennosolosuhteita. Soluja kasvatetaan sopivassa astiassa, esimerkiksi mikromaljan syvenyksissä, ja supernatantista tutkitaan monoklonaaliset vasta-aineet, joilla on haluttu spesifisyys.

On olemassa erilaisia menetelmiä monoklonaalisten vasta-aineiden saantojen parantamiseksi, kuten hybridomasolujen injektointi solut hyväksyvän nisäkkään vatsa-onteloon ja vesivatsanesteen talteenotto. Jos vesivatsanesteeseen kertyy riittämätön määrä monoklonaalista vasta-ainetta, vasta-aine otetaan talteen isännän verestä. On olemassa erilaisia tavanomaisia tapoja monoklonaalisten vasta-aineiden eristämiseksi ja niiden puhdistamiseksi muista proteiineista ja muista epäpuhtauksista (katso Köhler ja Milstein, supra).

Esimerkkinä eräästä tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoisesta monoklonaalisesta vasta-aineesta on uusi vasta-aine, jota tuottaa jatkuva hybridisolulinja, josta käytetään nimitystä 3D8. Tämä monoklonaalinen vasta-aine sitoutuu determinantteihin, joita on antigeeneillä, jotka ovat soluun sitoutuneita HTLV-III-geenituotteita. AIDSilla infektoituneiden solujen lysäätteille tehdään yksisuuntainen natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielek-roforeesi (SDS-PAGE). Nitroseluloosaan sidottu monoklonaalinen vasta-aine kehitettiin SDS-PAGE-geelin avulla Western Blot-menetelmää käyttämällä. Määritettiin, että vasta-aine 3D8 sitoutuu 55 ja 65 kilodaltonin käänteistransskriptaasiin (p55 ja p65), 24 kilodaltonin ydinproteiiniin (p24), 41 kilodaltonin glykoproteiinivaippa-antigeeniin (gp41) ja yhteen määrittelymättömään 39 kilodaltonin proteiiniin (p39). Antigeeneja, joista käytetään merkintöjä p55 ja p65, ydinproteiiniantigeenia p24 ja glykoproteiinivaippa-antigeenia gp41 on kuvattu julkaisussa Science 231 (1986) 1289-1291. Määrittelymättömät proteiinit p28, p39, p49 ja p52 saattavat olla antigeeneja, jotka ovat sitoutuneita soluun mutta eivät HTLV-III-geenituotteita. Näitä antigeeneja saattaa syntyä AIDS-virusinfektion seurauksena, ja ne saattavat osoittaa solun olevan infektoitunut. Toisaalta -28-, -49- ja p52-proteiinit saattavat olla virus-

5 tuotteita, jotka eivät ole immunogeenisiä ihmisessä. p41-, p55- ja p65-antigeenit näyttävät olevan liukoisia antigeenejä. Western Blot-havaintojen perusteella vasta-aine 3D8 ja jäljempänä kuvattavat vasta-aineet saattavat tunnistaa eri determinantteja edellä kuvatuilla antigeeneilla. 3D8-vasta-aine on isotyyppiä IgM. Vasta-aine 3D8 ei sitoudu normaaleihin lymfosyytteihin eikä solulinjojen H9 ja CEM soluihin.

10 Eräs toinen tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoinen monoklonaalinen vasta-aine on uusi vasta-aine, jota tuottaa jatkuva hybridisolulinja, josta käytetään merkintää 3F7. Samanlainen määrittäminen, jossa käytettiin SDS-PAGEa ja Western Blot-menetelmää, osoitti, että vasta-aine 3F7 sitoutuu p24-antigeeniin, p49-antigeeniin, p55-antigeeniin ja p65-antigeeniin. Vasta-aine 15 3F7 on isotyyppiä IgG 1. Vasta-aine 3F7 ei sitoudu voimakkaasti normaaleihin lymfosyytteihin eikä H9- eikä CEM-soluihin. Termillä "voimakkaasti" tarkoitetaan sitä että värjäytyneiden ja värjäytymättömien solujen piikit erottuvat virtaussytometriassa.

20 Eräs toinen tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoinen monoklonaalinen vasta-aine on uusi vasta-aine, jota tuottaa jatkuva hybridisolulinja, josta käytetään merkintää 3G12. SDS-PAGEN ja Western Blot-menetelmien yhdistelmällä määritettiin, että vasta-aine 25 3G12 sitoutuu p24- ja p55-antigeeniin. Vasta-aine 3G12 on isotyyppiä IgG 1. Vasta-aine 3G12 ei sitoudu voimakkaasti normaaleihin lymfosyytteihin eikä CEM-soluihin.

30 Eräs toinen tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoinen vasta-aine on uusi vasta-aine, jota tuottaa jatkuva hybridisolulinja, josta käytetään merkintää 2A11. Vasta-aine 2A11 sitoutuu p24-, p39- ja p65-antigeeniin. Vasta-aine 2A11 on isotyyppiä IgM. Vasta-aine 2A11 ei sitoudu voimakkaasti normaaleihin lymfosyytteihin eikä H9- eikä CEM-solulinjoihin.

35

Eräs toinen tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoinen monoklonaalinen vasta-aine on uusi vasta-aine, jota tuottaa jatkuva hybridisolulinja, josta käytetään merkintää 4G2. SDS-PAGElla ja Western Blot-menetelmällä tehtyjen määritysten mukaan vasta-aine 4G2
 5 sitoutuu p24- ja p55-antigeeniin. Vasta-aine 4G2 ei sitoudu voimakkaasti normaaleihin lymfosyytteihin eikä H9- eikä CEM-soluihin.

Eräs toinen tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoinen monoklonaalinen vasta-aine on uusi
 10 vasta-aine, jota tuottaa jatkuva hybridisolulinja, josta käytetään merkintää 1E2. Tämä monoklonaalinen vasta-aine sitoutuu p55- ja p49-antigeeniin. Vasta-aine 1E2 on isotyyppiä IgM. Vasta-aine 1E2 ei sitoudu voimakkaasti
 15 normaaleihin lymfosyytteihin eikä CEM-soluihin.

Eräs toinen tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoinen monoklonaalinen vasta-aine on uusi vasta-aine, jota tuottaa jatkuva hybridisolulinja, josta käytetään merkintää 3G8. Vasta-aine 3G8 sitoutuu p24-, p39-
 20 ja p41-antigeeniin. Vasta-aine 3G8 on isotyyppiä IgM. Vasta-aine 3G8 ei sitoudu voimakkaasti normaaleihin lymfosyytteihin eikä H9- eikä CEM-soluihin.

Eräs toinen tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoinen monoklonaalinen vasta-aine on uusi
 25 vasta-aine, jota tuottaa jatkuva hybridisolulinja, josta käytetään merkintää 1C11. Vasta-aine 1C11 sitoutuu P55- ja P65-antigeeniin. Vasta-aine 1C11 on isotyyppiä IgM. Solulinja 1C11 saatiin kloonaamalla uudelleen solulinja 3D8. Solulinja 3D8 on ilmeisesti kahden solulinjan, nimittäin 3G8:n ja 1G11:n, seos. Kun viljellään yksittäisiä
 30 3D8-linjan soluja saadaan kaksi solulinjaa 3G8 ja 1C11. 3G8:n ja 1C11:n yhdistetyt Western Blot-mallit peittävät täysin 3D8:n Western Blot-mallin.

Keksinnön ja monoklonaalisen vasta-aineen määrittelyn piiriin kuuluvat myös monoklonaalisen vasta-aineen
 35

käyttökelpoiset sitoutuvat fragmentit, kuten Fab, F(ab')₂, Fv jne. Vasta-ainefragmentteja saadaan tavanomaisin menetelmin. Käyttökelpoisia sitoutuvia fragmentteja voidaan valmistaa esimerkiksi peptidaasipilkkomalla vasta-aine
 5 käyttämällä papaiinia tai pepsiniä.

Vaikka edellä esitetyt erityisesimerkit keksinnön mukaisista uusista vasta-aineista koskevat ryhmiin IgG ja IgM kuuluvia vasta-aineita, jotka ovat peräisin hiirestä, ei tätä ole tarkoitettu rajoitukseksi. Edellä mainittut vasta-aineet ja edellä mainittujen vasta-aineiden
 10 kanssa funktionaalisesti ekvivalenttiset vasta-aineet, olivatpa ne peräisin hiirestä, muusta nisäkkästä ihminen, rotta ja muut lähteet mukaan luettuina tai tällaisten lähteiden yhdistelmistä, kuuluvat tämän keksinnön piiriin, samoin kuin muut vasta-aineryhmät, kuten IgA, IgE tms mukaan luettuina tällaisten ryhmien sisäiset isotyypit sekä
 15 myös ryhmiin IgG ja IgM kuuluvat muut isotyypit. Termillä "funktionaalisesti ekvivalenttinen" tarkoitetaan sitä, että vasta-aineella on kyky sitoutua edellä kuvattuun antigeeniin ja kilpailla keksinnön mukaisen vasta-aineen kanssa sitoutumisesta tällaiseen antigeeniin. Tämä tarkoittaa sitä, että tällainen vasta-aine yhdistettynä
 20 mainitunlaista antigeenia sisältävään näytteeseen sitoutuu antigeeniin ja estää keksinnön mukaisen vasta-aineen sitoutumisen mainittuun antigeeniin. Nisäkkäiden (esimerkiksi ihmisen) monoklonaalisia vasta-aineita voidaan valmistaa menetelmillä, joita kuvataan julkaisuissa Olsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5249-5431; ja Engelman et al., Human Hybridomas and Mono-
 30 clonal Antibodies, Plenum Press, N.Y., N.Y. 1985. Fuusiointimenetelmät ovat samanlaisia kuin edellä hiirihybridomien valmistuksen yhteydessä kuvatut. Seuraavat solulinjat ovat esimerkkejä solulinjoista, joita voidaan käyttää jatkuvien hybridisolulinjojen valmistuksessa; NS-1 (American Type
 35 Culture Collection, Rockville, Maryland, ATTC), SP-2

(ATTC) ja HL-1 (Ventrex, Portland, Maine).

Toteutettaessa tämän keksinnön mukaista menetelmää otetaan kohteesta elimistönestenäyte ja käsitellään se seuraavasti: Lymfosyyttien valmistamiseksi erotetaan yksitumaiset solut muusta verestä. Ääreisveri esimerkiksi tehdään hyytymättömäksi hepariinilla, laimennetaan yhtä suurella tilavuudella fosfaattipuskuria ja tiheysgradienttisentrifugoidaan, jolloin yksitumaiset solut (pääasiassa lymfosyyttejä) erottuvat muusta verestä. Solut pestään sitten puskurilla ja suspendoidaan puskuuriin yhdessä pienen määrän (esim. 0,01-1 %, edullisesti noin 0,1 %) kanssa gelatiinia ja pienen määrän kanssa (esim. 0,01-1 %, edullisesti noin 0,1 %) kanssa natriumatsidia pitoisuudeksi 5×10^6 solua/ml. Valkosolut voidaan vaihtoehtoisesti erottaa tekemällä hemolyysi kokoverelle.

Seerumin preparoimiseksi ääreisverta laitetaan tyhjään lasiputkeen, annetaan sen hyytyä ja sentrifugoidaan sitten seerumin erottamiseksi hyytymästä.

Näytteen määrä riippuu kulloinkin käytettävän määrittämenetelmän luonteesta ja kulloinkin analysoitavasta elimistön nesteestä. Seuraavat näytemäärät annetaan esimerkinomaisesti eikä rajoittavassa mielessä; alan ammattimiehet pystyvät toteuttamaan tämän keksinnön mukaista menetelmää laajasti käytännössä tässä annettavan kuvauksen perusteella. Seerumi- tai plasmanäytteiden ollessa kyseessä näytemäärä on yleensä noin 0,1-5,0 ml, edullisesti 1,0-2,0 ml. Siemennestenäytteiden määrä on yleensä noin 0,05-1,0 ml, edullisesti 0,1-0,5 ml.

Näyte saatetaan seuraavaksi kosketukseen yhden tai useamman edellä mainitun vasta-aineen tai niiden yhdistelmän kanssa olosuhteissa, joissa vasta-aine sitoutuu näytteessä olevaan antigeeniin, jolloin muodostuu immuunits antigeeni-vasta-ainekomplekseja. Määrittäksen luonteen mukaan vasta-aine voidaan sitoa alustaan, tai se voi

olla vesipohjaisessa väliaineessa. Vasta-aineen ja näytteen saattaminen kosketukseen toistensa kanssa toteutetaan yleensä vesipohjaisessa puskuroidussa väliaineessa. Käyttökelpoisiin puskureihin kuuluvat fosfaatti-, tris-, bikarbonaatti- jne puskurit. Käytettävä pH-arvo riippuu näytteen ja vasta-aineen luonteesta ja on yleensä noin 5-8. Vesipohjainen väliaine voi lisäksi sisältää orgaanisia polaarisia liuottimia pitoisuuksina noin 0-40 %. Orgaaniset polaariset liuottimet ovat vesiliukoisia, ja sisältävät yleensä noin 1-10 hiiliatomia ja noin 1-4 happiatomia. Myös vasta-ainepitoisuus riippuu määrittä-

15 Kun näytteen ja vasta-aineen kontaktiaika on kulunut ja määrittäksen luonteesta riippuen, yhdistelmä voidaan käsitellä reagoimattoman vasta-aineen poistamiseksi. Tämä voidaan tehdä pesemällä vesipohjaisella, tavallisesti puskuroidulla, väliaineella. Yleisesti ilmaistuna pesuliuoksen määrän tulisi olla riittävä reagoimattoman vasta-aineen poistamiseksi. Pesuvaiheiden lukumäärä ja tyyppi riippuu siitä käytetäänkö heterogeenista vai homogeenista määrittästä.

Seuraavaksi tehdään havaintoja vasta-aineen sitoutumisesta näytteessä olevaan antigeeniin; sitoutuminen on osoitus AIDSiin liittyvän viruksen aiheuttamasta infektiosta kohteessa. Tämä tarkoittaa sitä, että määritetään muodostuneiden antigeeni-vasta-ainekompleksien (immuunikompleksien) määrä. Sitoutumisen tapahtumisen määrittämiseksi määrittäsjärjestelmään sisällytetään keino detektoitavissa olevan signaalin, joka on suhteessa antigeenin esiintymiseen näytteessä, tuottamiseksi. Määrittäksessä käytettävä vasta-aine voidaan esimerkiksi konjugoida merkkiaineeseen, joka on aine, jolla on kyky tuottaa detektoitavissa oleva signaali, joka on suhteessa AIDSiin liittyvän virusinfektion läsnä- tai poissaoloon. Merkki-

aine voi olla esimerkiksi entsyymi, radioisotooppi, hiukkanen, alusta, kromogeeni, kemiluminesoiva aine, fluoresoiva aine, koentsyymi, vapaa radikaali tai bakteriofagi. Vasta-aineelle käytettävien merkkiaineiden lukumäärän määräävät yleensä tämän keksinnön mukaisen menetelmän asettamat vaatimukset ja kohtien, joista merkkiaineet voidaan liittää vasta-aineisiin, saatavuus. Menetelmät merkkiaineiden kytkemiseksi vasta-aineisiin ovat alalla tunnettuja. Katso esimerkiksi US-patenttijulkaisut 4 720 450; 4 235 869; 3 935 074; ja 3 996 345.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää leimattua vasta-aineelle spesifistä sitoutumiskumppania, joka voi olla esimerkiksi käytettävälle vasta-aineelle spesifinen leimattu vasta-aine tai leimattu antigeeni, joka sitoutuu vasta-aineeseen. Kun monoklonaalinen vasta-aine on peräisin hiirestä, voidaan käyttää menetelmässä käytettävälle vasta-aineelle spesifistä leimattua anti-hiiri-immunoglobuliinia. Tällaisia immunoglobuliineja voidaan muodostaa tavanomaisin menetelmin injektoimalla monoklonaalista vasta-ainetta sopivaan isäntään, odottamalla asianmukainen aika ja ottamalla talteen anti-hiiri-immunoglobuliinit injektoidun isännän verestä.

Tämän keksinnön mukaista menetelmää ja vasta-aineita voidaan soveltaa useimpiin määrityksiin, joihin liittyy antigeenin ja vasta-aineen välisiä reaktioita. Määritykset voivat olla homogeenisia tai heterogeenisia. Homogeenisen lähestymistavan ollessa kyseessä näyte voidaan esikäsitellä tarpeen vaatiessa epätoivottavien aineiden poistamiseksi. Immunologisessa reaktiossa on yleensä mukana spesifinen vasta-aine, leimattu analysoitava aine ja kiinnostuksen kohteena oleva näyte. Merkkiaineen antama signaali muuttuu, suorasti tai epäsuorasti, vasta-aineen sitoutuessa leimattuun analysoitavaan aineeseen. Sekä immunologinen reaktio että sen laajuuden detektointi tehdään homogeenisessa liuoksessa. Käyt-

tökelpoisiin immuunikemiallisiin merkkiaineisiin kuuluvat vapaat radikaalit, fluoresoivat väriaineet, entsyymit, bakteriofagit, koentsyymit jne. Esimerkkinä homogeenisista määrittelyksistä on entsyymimoduloitu immuunimääritys-menetelmä (EMIT[®]), jota kuvataan US-patentti julkaisussa 3 817 837.

Heterogeenisen lähestymistavan ollessa kyseessä reagensseina ovat tavallisesti näyte, vasta-aine ja väli-
ne detektoitavissa olevan signaalin tuottamiseksi. Näyte
10 sijoitetaan tavallisesti alustalle, kuten maljalle tai
levylle, ja saatetaan kosketukseen vesifaasissa olevan
vasta-aineen kanssa. Alusta erotetaan sitten nestefaa-
sista, ja joko alustafaasista tai nestefaasista tutki-
taan detektoitavissa oleva signaali käyttämällä välinet-
15 tä tällaisen signaalin tuottamiseksi. Keinoihin detektoi-
tavissa olevan signaalin tuottamiseksi heterogeenisissä
määrittelyksissä kuuluvat radioaktiivisten merkkiaineiden,
fluoresoivien aineiden, entsyymien jne käyttö. Esimerk-
kejä heterogeenisistä immuunimäärityksistä ovat radio-
20 immuunimääritys (RIA), immuunifluoresenssimenetelmät ja
immuunimääritykset, joissa käytetään kytkettyä entsyymiä,
kuten entsyymikytketty immuunisorgentti-määritykset
(ELISA, katso US-patenttijulkaisu 3 654 090; 3 839 153;
3 850 752; 4 016 043; ja Reissue-julkaisu 29 169).

25 Edellä mainittuja immuunimääritysmenetelmiä kä-
sitellään yksityiskohtaisemmin teoksessa Edward T. Maggio,
Enzyme-Immunoassay, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
1980. Katso myös esimerkiksi US-patenttijulkaisut nro
3 690 834; 3 791 932; 3 817 837; 3 850 578; 3 853 987;
30 3 867 517; 3 901 654; 3 935 074; 3 984 533; 3 996 345;
4 098 876; jota luetteloa ei ole tarkoitettu kattavaksi.

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän eräässä eri-
tyissuoritusmuodossa, joka esitetään valaisus- eikä rajoit-
tamismielessä, käytetään alustaa, kuten levyä tai petri-
35 maljan syvennystä. Menetelmässä kiinnitetään analysoitava

näyte alustaan sopivalla kiinnitysaineella, kuten asetonilla, ja inkuboidaan levyllä olevaa näytettä keksinnön mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen kanssa. Kun levy on pesty sopivalla puskurilla, kuten esimerkiksi fosfaattipuskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella, alusta saatetaan kosketukseen monoklonaaliselle vasta-aineelle spesifisen leimatun sitoutumiskumppanin kanssa. Kun on inkuboitu haluttu aika, levy pestään toisen kerran vesipohjaisella puskurilla, ja määritetään monoklonaalisen vasta-aineen sitoutuminen näytteeseen. Jos merkkiaine on fluoresoiva, levy voidaan peittää peiteliuskalla olevalla fluoresoivan vasta-aineen preparointiliuoksella ja tutkia sitten fluorenssimikroskoopilla sitoutumisen voimakkuuden määrittämiseksi. Merkkiaine voi toisaalta olla keksinnön mukaiseen monoklonaaliseen vasta-aineeseen konjugoitu entsyymi, ja sitoutumisvoimakkuus voidaan määrittää tutkimalla levyltä entsyymiaktiivisuus, joka voidaan osoittaa saostuman, värin tms muodostumisen kautta.

Tämä keksinnön eräässä toisessa erityissuoritusmuodossa käytetään pintaa, johon keksinnön mukainen monoklonaalinen vasta-aine kiinnitetään. Pinnan alla oleva rakenne voi olla muodoltaan ja koostumukseltaan vaihteleva, ja se voi olla koostumusseos, laminaatti tai niiden yhdistelmä. Esimerkkejä pinnoista ovat tyynyt, helmet, levyt tai liuskat, jotka voivat olla tasaisia, kuperia tai koveria. Paksuus ei ole ratkaiseva, ja se on yleensä noin 0,1-2 mm, ja läpimitta tai muut mitat voivat olla halutunlaisia. Pinta on tyypillisesti tuettuna sauvalle, putkelle, kapillaarille, kuidulle, liuskalle, levyille, maljalle, kyvetille tms. Pinta on tyypillisesti huokoinen ja polyfunktionaalinen tai tehtävissä polyfunktionaaliseksi, niin että keksinnön mukaisella monoklonaalisella vasta-aineella samoin kuin muilla yhdisteillä, jotka muodostavat osan detektoitavissa olevan

signaalin muodostamisjärjestelmästä, on mahdollisuus sitoutua kovalenttisesti pintaan.

Kiinteän pinnan materiaalina voidaan käyttää monia erilaisia orgaanisia ja epäorgaanisia polymeerejä, jotka voivat olla luonnon tai synteettisiä polymeerejä, sekä niiden yhdistelmiä. Valaisevia esimerkkejä polymeereistä ovat polyeteeni, polypropeeni, poly(4-metyylibuteeni), polystyreeni, polymetakrylaatti, poly(eteenitereftalaatti), raion, nailon, poly(vinyylibutyraatti), silikonit, polyformaldehydi, selluloosa, selluloosa-asettaatti, selluloosanitraatti, lateksi jne. Muihin käyttökelpoisiin materiaaleihin kuuluvat paperi, lasit, keräämiset aineet, metallit, metalloidit, puolijohdemateriaalit, metallikeraamiset aineet, silikaatit tms. Keksinnön yhteydessä käyttökelpoisiin aineisiin kuuluvat myös substraattit, jotka muodostavat geelejä, gelatiinit, lipopolysakkaridit, silikaatit, agarooosi ja polyakryyliamidit tai polymeerit, jotka muodostavat useita vesipitoisia faaseja, kuten dekstraanit, polyalkyleeniglykolit (C_{2-3} -alkyleeni) tai pinta-aktiiviset aineet, kuten fosfolipidit.

Keksinnön mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen sitominen pintaan voidaan tehdä tunnetuin menetelmin, joita kuvataan paljon kirjallisuudessa. Katso esimerkiksi Ichiro Chibata, Immobilized Enzymes, Halstad Press, New York 1978 ja Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245 (1970) 3059.

Toteutettaessa keksinnön tämän suoritusmuodon mukainen määritysnäyte sekoitetaan vesipohjaiseen väliaineeseen, ja väliaine saatetaan kosketukseen keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta sisältävän pinnan kanssa. Signaalinmuodostusjärjestelmän jäsenet ja mahdolliset apuaineet voidaan myös sisällyttää vesipohjaiseen väliaineeseen tai lisätä myöhemmin pintaan liittyvän detektoitavissa olevan signaalin muodostamiseksi. Keinona detektoitavissa olevan signaalin tuottamiseksi voi olla leimatun analysoitavan aineen sisällyttäminen väliaineeseen.

seen tai toisen monoklonaalisen vasta-aineen, johon on kytketty merkkiaine, käyttö. Tarvittaessa toteutetaan erotus- ja pesuvaiheet. Detektoitu signaali on suhteessa AIDSiin liittyvän infektion läsnäoloon. Keksinnön piiriin
 5 kuuluu sekä kalibrointi- että mittauspinnan sisällyttäminen samalle alustalle.

Erilaisia yleisiä menetelmiä, joita käsiteltiin edellä pinnalla tehtävän määrittämyksen toteuttamisen suhteen, käsitellään laajemmin esimerkiksi US-patenttijulkaisuissa 4 299 916; 4 391 904; 4 533 629; ja 4 540 659.
 10

Eräs esimerkki tämän keksinnön mukaisesta menetelmästä ja uusista vasta-aineista on virtaukseton sytometriamenetelmä. Analysoitava näyte ja tämän keksinnön mukainen merkkiaineeseen kytketty monoklonaalinen vasta-
 15 aine yhdistetään, ja niitä inkuboidaan olosuhteissa, joissa tapahtuu agglutinaatio, kun näyte sisältää AIDSiin liittyvää virusantigeenia. Edulliset inkubointiajat ovat noin 10-600 s, edullisesti noin 10-200 s matalahkoissa lämpötiloissa, tavallisesti noin 10-37°C:ssa.
 20 Inkuboinnin jälkeen väliaine tutkitaan mahdollisen agglutinaation seurauksena tapahtuneen fluoresenssimuutoksen määrittämiseksi. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää virtauksetonta sytometristä menetelmää, jossa käytetään halkaisijaltaan pientä valonsädettä, joka tuotetaan rakojen tai edullisesti laserin avulla, erottamaan hiukkaset suhteellisen kokonsa mukaan. Tässä menetelmässä käytetään fluoresenssipulssin korkeusanalyysiä tai fluoresenssihuojunnan korjausta (Briggs et al., Homogeneous Fluorescence Immunoassay, Science 212 (1981) 1266-1267
 25 ja Nicoli et al., Fluorescence Immunoassay Based on Long-time Correlations of Number Fluctuations, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7(8) (1980) 4904-4908).

Eräessä edullisessa menetelmässä fluoresenssin muuttumisen määrittämiseksi virtauksettomalla sytometrisellä menetelmällä käytetään kuituoptiikkasytometriä,
 35

jota kuvataan US-patenttijulkaisussa 4 564 598. Tässä julkaisussa esitetään menetelmä ja laite hiukkasten läsnäolon toteamiseksi dispersiossa, jolla menetelmällä voidaan todeta kiinnostuksen kohteena olevan aineen läsnäolo tai määrä. Optista kuitua käytetään määräämään suhteellisen pieni tilavuus, josta fluoresenssisäteily voidaan ottaa vastaan ja laskea. Tämä tilavuus on suhteessa tilavuuteen, jossa esiintyy todennäköisesti vain yksi hiukkanen tai muutamia hiukkasia, mikä johtaa ennalta määriteltyn huojuntaan. Käyttämällä erilaisia menetelmiä, jotka mahdollistavat fluoresenssihuojunnan muuttumisen suhteessa analysoitavan aineen läsnäoloon näytteessä, voidaan määrittää analysoitavan aineen läsnäolo. Huojuntaa tarkkaillaan tietyn aikaa staattisesti tai tutkimalla useita tilavuuksia näytteessä. Määritys tehdään sitten vertaamalla saatuja tuloksia tuloksiin, joita saadaan liuoksilla, jotka sisältävät tunnetun määrän analysoitavaa ainetta.

Eräässä toisessa tämän keksinnön erityissuoritusmuodossa käytetään keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita "kokosolu-ELISA-testissä" HTLV-III:n esiintymisen osoittamiseen lymfosyyteillä. Lyhyesti esitetynä spektrofotometrisessä menettelyssä eristetään ääreisveren lymfosyytit esimerkiksi tiheysgradienttisentrifugoinnilla ja suspendoidaan ne vesipohjaiseen proteiinia sisältävään väliaineeseen (esimerkiksi vesipohjaiseen väliaineeseen, joka sisältää naudan sikiöseerumia, glutamiiniä ja RPMI-1640:ä). Pieni määrä, esimerkiksi 50 μ l, solususpensiota voidaan lisätä 96-syvennyksisen mikromaljan syvennyksiin ja inkuboida esimerkiksi noin 1 min - 5 tuntia. Kun soluilla päällystetyt syvennykset on pesty, lisätään kuhunkin syvennykseen keksinnön mukaista vasta-ainetta, ja inkuboidaan 1 min - 3 tuntia. Pesun jälkeen lisätään kuhunkin syvennykseen kromogeenista substraattia, esimerkiksi ortofenyleenidiamiinia ja vety-

peroksidia, ja inkuboidaan 1 min - 1 tunti. Tulokset voidaan lukea spektrofotometrisesti. Mikroskooppimenetelyssä inkuboidaan puskuroitua lymfosyyttisuspensiota vasta-aineen kanssa 1 min - 3 tuntia lämpötilassa 0-37°C. Solut pestään ja sekoitetaan sitten edellä mainitun vasta-aineen vastaisen entsyymileimatun vasta-aineen kanssa 1 min - 3 tuntia lämpötilassa 0-37°C. Pesun jälkeen lisätään entsyymin substraattia, ja soluista tutkitaan signaalin läsnäolo.

Eräässä toisessa tämän keksinnön mukaisessa suoritustemuodossa käytetään Dot Blot-menetelmää AIDS-virusinfektioon liittyvän antigeenin läsnäolon osoittamiseen. Tällaista lähestymistapaa käytettäessä pieni määrä, esimerkiksi 1 µl, potilaan seerumia laitetaan nitroselluloosaliuskalle normaaliseeruminäytteen viereen. Liuskaa pidetään sitten puskuroidussa vesipohjaisessa väliaineessa, esimerkiksi gelatiinipitoisessa fosfaattipuskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa, joka sisältää keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta, noin 1-60 min, minkä jälkeen lisätään monoklonaalisen vasta-aineen vastaista leimattua vasta-ainetta.

Eräässä toisessa tämän keksinnön mukaisessa suoritustemuodossa käytetään virtaussytometriaan perustuvaa menetelmää lymfosyyteillä olevan HTLV-III-viruksen osoittamiseen. Virtaussytometria tarkoittaa fluoresenssitoimisella solulajittelijalla (FACS) tehtävää analyysiä. Virtaussytometrian toimintaperiaatteesta on esitetty yksityiskohtaisia katsauksia. Katso esimerkiksi Bonner et al. Rev. Scient. Instrum. 43 (1972) 404-409; Herzenberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 76 (1979) 1453-1455; Miller et al., J. Immunol. Methods 47 (1981) 13-24; Loken et al., ibid. 50 (1982) R85-R112; ja Kruth, Anal. Biochem. 125 (1982) 225-242. Fluoresoivalla vasta-aineella leimatun näytteen yksittäissolususpensio johdetaan solu kerrollaan ohuen lasersäteiden läpi. Emittoituva fluoresenssi

kerätään optisella järjestelmällä suorassa kulmassa tulevaan säteilyyn nähden. Kunkin yksittäisen solun emittoima fluoresenssi mitataan ja talletetaan, ja kyseessä olevan antigeenin läsnäolo määritetään talletetuista tiedoista.

Tämän keksinnön erään puolen mukaisesti AIDS-virusinfektio detektoidaan tekemällä kliinisten näytteiden lyhyt virusviljely. Näytettä viljellään H9- tai CEM-solujen kanssa, minkä jälkeen tehdään detektointi virtaussytometria-, levytesti- tms. periaatteella. "H9" on eräs T-solu-lymfoomasolulinja, "CEM" on eräs toinen T-solu-lymfoomasolulinja. "Lyhyellä" tarkoitetaan 2-48 tuntia, edullisesti 10-14 tuntia; nykyinen menetelmä vaatii 20-30 vrk.

Tämän keksinnön piiriin kuuluu myös keksinnön mukaisten menetelmien ja uusien monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö seulontatestissä AIDSiin liittyvien virusantigeenien vasta-aineiden osoittamiseksi seerumista. Potilasnäytteet voidaan tutkia esimerkiksi käyttämällä jotakin tunnettua vasta-aineiden osoitusmenetelmää. Siten voidaan löytää potilaat, joissa esiintyy tällaisia vastaaineita. Tällaiset potilaista otetut näytteet voidaan sitten analysoida tämän keksinnön mukaisesti sen määrittämiseksi, onko tällaisella potilaalla AIDS-virusinfektio.

Keksintö koskee myös diagnostisia välineistöjä edellä esitetyn menetelmän toteuttamiseksi. Reagenssit voivat olla välineistössä pakattuna yhdistelmänä samois- sa tai eri säiliöissä, niin että reagenssien suhteilla saadaan suurin piirtein aikaan paras mahdollinen signaalin reagointi analysoitavan aineen pitoisuusvaihteluihin. Eräässä suoritussuodossa diagnostinen välineistö voi sisältää

(a) edellä tarkemmin määriteltä monoklonaalista vastaainetta tai tällaisten vasta-aineiden yhdistelmää ja

(b) edellä mainitun monoklonaalisen vasta-aineen spesifisen sitoutumiskumppanin ja detektoitavissa olevan signaalin tuottamaan kykenevän merkkiaineen konjugaattia. Reagensseihin voi kuulua myös apuaineita, kuten puskureita ja proteiinia stabiloivia aineita, esimerkiksi polysakkarideja tms. Diagnostinen välineistö voi sisältää tarvittaessa lisäksi signaalinmuodostusjärjestelmän, jonka jäsenenä merkkiaine on, muita jäseniä, aineita taustahäiriöiden vähentämiseksi testin yhteydessä, vertailureagensseja, laitteiston testin suorittamiseksi tms.

Eräässä toisessa suoritussuodossa diagnostinen välineistö voi sisältää keksinnön mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen ja detektoitavissa olevan signaalin tuottamaan kykenevän merkkiaineen konjugaattia. Läsnä voi olla myös edellä mainittuja apuaineita.

Keksintöä valaistaan edelleen seuraavin esimerkein.

Esimerkki 1

HTLV-III-antigeenien vastaisten monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen

Kolmen kuukaudenikäiset BALB/c- ja RBF/DN-naaras-hiiret immunisoitiin HTLV-III-antigeenivalmisteilla. Antigeenivalmiste oli osittain puhdistettu viruslysaatti, joka oli peräisin HTLV-III:n kasvatuksesta ihmisen lymfoomasolulinjassa H9, joka saatiin the National Cancer Instituteesta (NCI). Hiiret immunisoitiin yksitellen polystyreenilateksihiukkasilla olevalla antigeenillä (5-20 µg) ja annettiin tehosteeksi viikon välein 10 µg liukoista antigeenia laskimonsisäisesti (iv) ja vatsaontelon sisäisesti (ip). Hiiristä kerättiin seerumia viikon väliajoin, ja tehtiin sille Western Blot-analyysi HTLV-III-virusantigeenien vastaisen vasta-aineen toteamiseksi. Western Blot-analyysi osoitti, että HTLV-III-antigeenin vastaisia vasta-aineita kehittyi progressiivisesti 5 vii-

kon immunisointijakson aikana. Hiiret, jotka reagoivat HTLV-III-virusantigeeneihin, valikoitiin fuusiointia varten 3, 4 ja 5 viikon immunisoinnin jälkeen. Splenosyytit fuusioitiin myeloomasolulinjaan SP-2 tai HL-1 käyttämällä julkaistuja menettelyjä /HL-1: Taggart et al., Science 219 (1983) 1228; SP-2: Schulman et al., Nature 276 (1978) 269/. Valittiin sellaiset tutkimusmenettelyt, joilla voitiin detektoida pitoisuutena 1-10 $\mu\text{g/ml}$ esiintyvä vasta-aine. Ensimmäisenä määrittäminen oli ELISA-menettely, jolla detektoitiin immunoglobuliinituotanto, ja jota seurasi ELISA-menettely HTLV-III-antigeenien toteamiseksi (taulukko 1), joka osoittaa, että monoklonaaliset vasta-aineet ovat spesifisiä HTLV-III-antigeenille. Positiivisten syvennysten viljelmiä lisättiin, ja ne testattiin Western Blot-analyysillä. Western Blot-analyysin mukaan positiiviset viljelmät kloonattiin ja karakterisoitiin. Tällä tavalla tuotettiin jatkuvat hybridisolulinjat 3D8, 3F7, 3G12, 2A11, 4G2 ja 1E2.

Muutamit edellä mainittujen solulinjojen tuottamat monoklonaaliset vasta-aineet tunnistavat useita vyöhykkeitä. Tämä voisi olla osoituksena yhteisten epitopien esiintymisestä eri proteiineilla, molekyylikooltaan erilaisten esiastemolekyylien tunnistamisesta tai eri proteiineilla olevan yhteisen hiilihydraattiepitoopin tunnistamisesta. Western Blot-liuoskojen käsittely natriumperjodaatilla ennen reaktiota monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa ei muuttanut merkittävästi värjäytymismallia. Tämä havainto vähentää todennäköisyyttä, että monoklonaaliset vasta-aineet detektoisivat hiilihydraattiepitooppeja. Mikään monoklonaalisista anti-HTLV-III-vasta-aineista ei reagoi normaalien lymfosyyttien tai kantalymposyyttisolulinjojen kanssa. Kolme niistä (1E2, 3F7 ja 3G12) reagoi kuitenkin H9-solujen kanssa. Tämä viittaa siihen, että HTLV-III-antigeenivalmiste on si-

HTLV-III-antigeenin detektointi virtauscyto-
metrisesti

Jotta saataisiin arvioiduksi joidenkin keksinnön mukaisten monoklonaalisten vasta-aineiden käyttöä lymfocyteillä esiintyvien HTLV-III-antigeenien detektointiin, päällystettiin lateksihelmet ($2,7\text{ }\mu\text{m}$) HTLV-III-antigeenilysaateilla ja detektoitiin antigeeni virtaussytometrisesti. Muutamat vasta-aineista tunnistivat HTLV-III-antigeenin, kuten osoittaa fluoresenssi-intensiteetin muuttuminen käytettäessä toisena vasta-ainereagenssina vuohen anti-hiiri-Ig:tä (TAGO, Burlingame, Kalifornia) (taulukko 2). Nämä kokeet osoittivat, että käyttämällä virtaussytometriä voitiin suurilta hiukkasilta detektoida HTLV-III-antigeeni käyttämällä tämän keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita.

20 Jatkokokeissa sidottiin HTLV-III-antigeeni latek-
sihelmille käyttämällä jotakin edellä mainituista mono-
klonaalisista vasta-aineista. Tätä varten absorboitiin
vasta-ainetta 1E2 tai 3D8 lateksihelmille, ja pestiin
helmet. Pestyt helmet saatettiin sitten kosketukseen
25 HTLV-III-viruslysaatin kanssa, pestiin toisen kerran ja
sekoitettiin sitten detektointivasta-aineen kanssa. De-
tektointiin käytettiin 3G12 (IgG₁-isotyyppiä). Pesun jäl-
keen saatettiin reagoimaan fluoresoiva toinen vasta-aine
vuohen gammaketjuspesifinen antihiiri-IgG ja preparaatti
30 tutkittiin virtaussytometrillä. Kuten taulukosta 3 on
nähtävissä, tämä sitomis- ja detektointijärjestelmä,
jossa käytetään näitä kahta monoklonaalista vasta-ainet-
ta, on tehokas keino HTLV-III-antigeenin identifioimi-
seksi. Monoklonaalisia vasta-aineita käytettiin myös
35 toisin päin, niin että 3G12 käytettiin antigeenin sitomi-

seen ja 3D8:aa sidottujen determinanttien identifioimiseen.

Esimerkki 4

HTLV-III-antigeenin osoittaminen AIDS-potilaiden verestä

5

Esimerkissä 3 kuvattua sitomismenetelmää, jossa käytetään kahta vasta-ainetta, käytettiin sitten HTLV-III-antigeenin sitomiseen AIDS-potilaiden ja vertailupotilaiden verinäytteistä. Vertailukokeessa, jossa käytettiin 20 varmistetusti HTLV-vasta-ainepositiivista näytettä, virus osoitettiin 12 näytteestä. Näytteet olivat positiivisia Western Blot-analyysissä, mutta vahvistusta suoran virusviljelyn avulla ei tehty.

10

Lisäkokeissa detektoitiin HTLV-III-antigeeni suoraan kliinisisistä näytteistä siirtämällä näyte nitroselluloosalle ja detektoimalla antigeeni muunnetulla ELISA-menetelmällä. Tällaista lähestymistapaa käytettäessä 1/ul potilaan seerumia laitetaan nitroselluloosaliuskalle normaaliseeruminäytteen (1/ul) viereen. Liuskaa pidetään sitten PBS-gelatiiniseoksessa 10 min ja sen jälkeen 1 tunti huoneen lämpötilassa seoksessa, joka sisältää alkaliseen fosfataasiin konjugoituja vuohen antihiirivasta-aineita PBS-gelatiiniseoksessa. Kun liuska on pesetty kolmesti, sille levitetään substraattia, joka koostuu bromikloori-indolifosfaatista (BCIP) ja nitrosinitetrasoliumista (NBT). Virusantigeenipositiiviset seeruminäytteet muodostavat tummanpunaisen täplän 10 min:ssä. Normaalialia seerumia sisältävissä täplissä ei esiinny värinkemitystä. Näiden kokeiden tulokset esitetään taulukossa

15

20

25

30

4. Klooni 3D8 ja 3G8 tunnistivat HTLV-III-antigeenin suurimmasta osasta AIDS-potilaiden näytteitä ja AIDS-positiivisia vertailuseerumeja, jotka saatiin the National Cancer Institutesta (NCI). Suoraa vertailua virusviljelmän kanssa ei tehty.

Esimerkki 5

HTLV-III:n detektointi käyttämällä kokosolumenetelmää

Käyttämällä muunnettua kokosolu-ELISA-menetelmää

5 detektoitiin HTLV-III-antigeenin ilmentyminen lymfosyyteillä, jotka olivat peräisin potilaista, jotka oli vahvistettu positiivisiksi Western Blot-analyysillä. Tässä testissä solut detektoitiin mikroskooppisesti. Detektointi voidaan tehdä myös spektrofotometrisesti. Spektrofotometrisessä menettelyssä eristettiin ääreisveren lymfositit tiheysgradienttisentrifugoinnilla ja suspendoitiin RPMI 1640-alustaan (tavanomainen kudosisviljelyalusta), joka sisälsi 2 mmol/l L-glutamiinia ja 20 % naudan sikiöseerumia, pitoisuudeksi 2×10^6 solua/ml. 50 μ l tätä solususpensiota lisättiin 96-syvennyksisen mikromaljan tasapohjaiseen syvennykseen, ja inkuboitiin noin 3 tuntia. Kun soluilla päällystetyt syvennykset oli pesty, niihin lisättiin monoklonaalista anti-HTLV-III-vasta-ainetta 3D8, ja inkuboitiin 3 tuntia. Pesun jälkeen lisättiin

20 kuhunkin syvennykseen sitraattipuskuroitua ortofenyleenidiamiini (OD)/vetyperoksidi-substraattia, ja inkuboitiin 30 min. Positiiviset värireaktiot luettiin spektrofotometrillä. Mikroskooppimenetelmässä lymfosyytit suspendoitiin fosfaattipuskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen, joka sisälsi 0,1 % gelatiinia, ja inkuboitiin monoklonaalisen vasta-aineen 3D8 kanssa 1 tunti lämpötilassa 4°C. Solut pestiin sitten kahdesti ja sekoitettiin niitä sitten alkaliseen fosfataasiin konjugoidun antihii-ri-IgG/IgM:n vuohen kanssa 1 tunti lämpötilassa 4°C. Kun solut oli pesty, ne sekoitettiin substraatin BCIP kanssa.

30 HTLV-III-positiiviset solut olivat värjäytyneet vaaleantummansinisiksi mikroskoopilla tarkasteltuna. Tulokset esitetään taulukossa 5.

Esimerkki 6

35 HTLV-III-esiintymisen detektointi lymfosyyteiltä virtauscytometrisesti

HTLV-III hyökkää T₄-lymfosyytteihin ja lisääntyy niissä. Tehtiin T₄-soluilla esiintyvän HTLV-III-antigeenin detektointi virtaussytometrisesti käyttämällä klooneja 3D8 ja 3G12. Tässä kokeessa käytetyt näytteet toimitti Oregon AIDS Task Force ilmoittamatta niistä saatuja tuloksia. Tehtyjä kokeita olivat solulinjojen T₁, T_H, T_S, B ja NK tutkiminen monoklonaalisilla vastaaineilla; Western Blot-analyysi; T_H/T_S-suhteen määrittäminen; edellä mainittujen kolmen monoklonaalisen vasta-

10 aineen suhteen positiivisten T_{pan}- ja T₄-ryhmien solujen prosenttiosuuden määrittäminen. Potilasryhmiin kuului oireellisia AIDS-, ARC- ja PGL-potilaita ja Western Blot-positiivisia, mutta oireettomia yksilöitä. Vertailunäytteet koostuivat suuririskisistä ryhmistä ja pieniriskisistä sukupuolen ja iän suhteen yhteensopivista yksilöistä. Tutkittuja potilaita oli 82. Tulokset esitetään taulukossa 6. 46 näytettä oli peräisin potilaista, joiden Western Blot-analyysi oli positiivinen HTLV-III-vasta-

15 aineen suhteen.

20 Monoklonaaliset vasta-aineet 3D8 ja 3G12 tunnistivat HTLV-III-antigeenin esiintymisen sekä T_{pan}- että T₄-lymfosyyteillä. Sairauden vakavuuden ja positiivisten solujen lukumäärän välillä vallitsi yleinen korrelaatio. Potilasryhmien alhaisimmat arvot mitattiin yksilöistä,

25 jotka olivat vielä oireettomia. Reagointi vaihteli siten, että 5-55 % T₄-soluista oli positiivisia 3D8:n tai 3G12:n suhteen. Vertailun vuoksi mainittakoon, että suuririskisessä vertailuryhmässä tämä arvo oli 0-5 %. Yhdestä vertailuyksilöstä mitattiin arvo 7,5 %. Mielenkiintoista oli se, että tämän potilaan T_H/T_S-suhde oli kääntynyt, vaikka hän tässä vaiheessa oli Western Blot-negatiivinen. 3G12:aa käytettäessä taustataso oli korkeampi, mutta myös solujen, joilla esiintyi HTLV-III-antigeenia, prosenttiosuudet olivat suurempia (katso taulukko 6).

30

35 Nämä tulokset osoittavat, että HTLV-III-antigeenin esiintyminen voidaan tehokkaasti osoittaa Western Blot-

positiivisten potilaiden T-soluilta jopa joissakin sel-
laisissa tapauksissa, että potilaat ovat vielä oireet-
tomia. Tämä saattaa olla myös keino viruksen esiintymi-
sen osoittamiseksi ennen vasta-aineiden muodostumista
5 suuririskisissä ryhmissä. Näissä tutkimuksissa käytet-
tiin lisävertailuryhminä herpes 1- ja 2-, CMV- ja hepa-
tiittipotilaita. Näiden virusvertailuryhmien potilailla
ei esiintynyt edellä mainittujen monoklonaalisten vasta-
aineiden tunnistamia antigeeneja.

10 Esimerkki 7

HTLV-III-antigeenin esiintymisen detektointi
H9-soluilta käyttämällä virtaussytometriaa
H9-solulinjaa käytetään yleisesti HTLV-III-anti-
geenin detektointiin tekemällä viljely ja arvioimalla
15 käänteistransskriptaasin tuotanto soluissa. Sen toteami-
seksi, että monoklonaaliset vasta-aineet 3D8, 1E2 ja
3G12 todella tunnistivat potilaiden T_4 -soluilla olevan
HTLV-III-antigeenin, tehtiin seuraava vertailukoe, jos-
sa käytettiin H9-soluja. H9-soluja kasvatettiin kahden
20 viruspitoisen preparaatin kanssa, joko soluttoman HTLV-
III-suspension tai T_4 -lymfosyyttien, joilla esiintyi
HTLV-III-antigeenia, kanssa. H9-solut tutkittiin 48 tun-
nin viljelyn jälkeen käyttämällä keksinnön mukaisia vas-
ta-aineita ja vertailuvasta-aineita. Kuten taulukosta 7
25 on nähtävissä kloonit 3D8, 1E2 ja 3G12 tunnistivat HTLV-
III-antigeenin H9-soluilta vain silloin, kun H9-solut oli-
vat infektoituja. Infektointi soluttomalla HTLV-III-
viruksella ja HTLV-III-positiivisilla T_4 -soluilla oli
yhtä tehokas; monoklonaalisella isotyypivertailuvasta-
30 aineella ei ollut vaikutusta.

HTLV-III-antigeenin detektointi kaupallisissa
määritysvälineistöissä

Monoklonaalinen vasta-aine Laimennus- Kaupallinen määritysvälineistö
suhde Litton industries ENI

3F7	10 ⁻²	2,0*	2,0
	10 ⁻³	1,102	1,430
	10 ⁻⁴	0,43	0,620
3D8	10 ⁻²	2,0	2,0
	10 ⁻³	1,712	1,430
	10 ⁻⁴	1,252	0,821
3G12	10 ⁻²	1,862	2,0
	10 ⁻³	0,721	0,928
	10 ⁻⁴	0,210	0,286
2A11	10 ⁻²	0,641	0,589
	10 ⁻³	0,112	0,126
	10 ⁻⁴	0,05	0,06
1E2	10 ⁻²	0,761	0,682
	10 ⁻³	0,112	0,153
	10 ⁻⁴	0,05	0,05

* = ELISA-absorbanssi (absorbanssiyksiköinä)

Taulukko 2

HTLV-III:lla päällystettyjen helmien mittaus
virtaussytometrillä käyttämällä monoklonaa-
lisiä anti-HTLV-III-vasta-aineita

Monoklonaalinen vasta-aine	Värjäytyneiden helmien prosenttiosuus
3G8	60
4G2	18
3D8	82
2A11	77
3G12	73
3F7	75
1E2	80
Anti- β -hCG ^a	0,8
RPMI 1640 ^b	0,8

a) Ihmisen β -korigonadotropiinin vasta-aine

b) Tavanomainen kudosisviljelyväliaine

Taulukko 3

HTLV-III-antigeenin detektointi seerumista
monoklonaalinen IgM-vasta-aine-sieppauksella -
monoklonaalisen IgG-vasta-aineen detektointi
käyttämällä lateksihelmiä

Helmellä oleva sieppausvasta- aine	Detektori- vasta-aine	Tutkittava näyte	Värjäytyneitä helmiä (%)
1E2	3G12	Normaali ihmisseerumi (NHS)	0,3
1E2	3G12	HTLV-III-virus- lysaatti a)	66,4
3D8	3G12	NHS	0,6
3D8	3G12	HTLV-lysaatti	43,4
3D8	3G12	AIDS-seerumi b)	4,9

a) Viruksella infektoiduista soluviljemäsoluista tehty
preparaatti; solut otetaan talteen, sentrifugoidaan ja
hajotetaan detergentillä.

b) Potilailta, joilla on kliininen AIDS, saatu seerumi

Taulukko 4

HTLV-III:n detektointi monoklonaalisella
vasta-aineella 3D8 käyttämällä täpläsiirto-
menetelmää

Tutkittujen näytteiden
kokonaismäärä 14

Näytteen luokitus Positiivisten täplien määrä

Kliininen AIDS	2/4
Western Blot-positiivinen	3/5
Western Blot-negatiivinen	0/5

Taulukko 5

HTLV-III:n detektointi mikroskooppi-kokosolu-
ELISA-menetelmällä käyttämällä monoklonaalista
vasta-ainetta 3D8

Näytteen luokitus Värjäytyneiden lymfosyyttien
prosenttiosuus

AIDS	19,0
AIDS	10,5
Western Blot-positiivinen	4,4
Western Blot-positiivinen	2,3
Western Blot-positiivinen	6,8
Western Blot-positiivinen	0,4
Western Blot-positiivinen	0,6

Taulukko 6

HTLV-III:n esiintymisen T⁴-lymfosyyteillä
osoittaminen virtauscytometrisesti

Ryhmä	Vertailu	Western Blot- positiivinen	)	AIDS	ARC/PGL	ASYM ^{c)}
Western Blot (+/-)	-	+	}	+	+	+
3D8/T4						
X ± SE	1,4 ± 0,3*	9,0 ± 4,2	}	25 ± 7	7,3 ± 1,4	5,8 ± 1,1
suhde:	$\frac{1}{35}$	$\frac{26}{20}$	}	$\frac{5}{1}$	$\frac{10}{5}$	$\frac{11}{14}$
#pos/#neg						
Tilastomate- maattiset tiedot	p ^a <	0,0001		0,0001 p ^b <	0,0001 0,05 p ^b <	0,0001 0,05 0,05
3G12/T4						
X ± SE	8,4 ± 2,8	28 ± 6,1	}	44 ± 10,1	29 ± 4,2	24 ± 4,8
suhde:	$\frac{1}{35}$	$\frac{32}{14}$	}	$\frac{5}{1}$	$\frac{12}{3}$	$\frac{16}{10}$
#pos/#neg						
Tilastomate- maattiset tiedot	p ^b <	0,0001		0,0001 p ^b <	0,0001 NS p ^b <	0,0001 0,06 NS

a) = Mann-Whitney:n U-testi b) = Fisher's Exact

c) = Asym = oireettomia potilaita, ts potilaita, jotka olivat sero-positiivisia AIDS-vasta-aineiden suhteen, mutta joilla ei ole havaittavia oireita, kuten ARC- tai PGL-potilailla esiintyviä suurentuneita imusolmukkeita tai AIDS-potilailla esiintyviä infektiosairauksia

* = Virtauscytometrisesti detektoitujen positiivisten solujen lukumäärä monoklonaalisia vasta-aineita 3D8 ja 3G12 sitovien T₄-lymfosyyttien prosenttiosuutena

Taulukko 7

HTLV-III:n esiintymisen H9-soluilla osoittaminen

Monoklonaali- nen vasta- aine	Ei mitään	H9-solulinjan käsittely	
		Infektointi soluvapaalla viruksella	Infektointi HTLV- III:lla + T ₄ - soluilla
Toinen vasta-aine; vertailunäyte	6,2*	6,4	3,1
	7,5	18,5	29,7
	14,9	40,8	41,9
	32,2	82,8	94,0
Vertailu- näyte	3,4	5,6	4,6

* = Positiivisten solujen prosenttiosuus virtauscytometrisesti mitattuna

Jatkuvat hybridisolulinjat 1E2, 3D8 ja 3G12 on talletettu the American Type Culture Collectioniin (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 Budapestin sopimuksen mukaisesti 19. toukokuuta 1986, ja niille on annettu ATCC-numerot HB9100, HB9101 ja vastaavasti HB9102. Jatkuvat hybridisolulinjat 3G8 ja 1C1 on talletettu ATCC:hen Budapestin sopimuksen mukaisesti 28. toukokuuta 1986, ja niille on annettu ATCC-numerot HB9114 ja vastaavasti HB9115.

Keksintöä on kuvattu yksityiskohtaisesti erityisesti edellä esitettyjen suoritusmuotojen kautta. Ymmärrettäneen kuitenkin, että voidaan tehdä variaatioita ja modifikaatioita poikkeamatta keksinnön hengestä ja piiristä.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä HTLV-III:n infektoimien solujen osoittamiseksi väliaineesta, t u n n e t t u siitä, 5 että saatetaan mainittu väliaine kosketukseen mainitun infektion tuloksena muodostuneen antigeenin vastaisten monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa ja detektoidaan mainittujen vasta-aineiden sitoutuminen mainittuun antigeeniin sillä ehdolla, että kun mainittu 10 antigeeni on virusgeenituote, mainitussa menetelmässä detektoidaan mainittujen vasta-aineiden sitoutuminen mainittuihin infektoituihin soluihin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu väliaine on ihmisen elimistön neste, edullisesti kokoveri, imuneste, 15 seerumi, plasma, siemenneste, sylki tai selkäydinneste, tai siitä, että mainittu väliaine on kasvualusta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu antigeeni on virusgeenituote tai sitoutunut virusgeenituotteeseen. 20

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittua antigeenia muodostuu mainitun infektion seurauksena eikä se ole virusgeenituote.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, 25 t u n n e t t u siitä, että mainittu antigeeni on sitoutuneena lymfosyyttiin, edullisesti T-auttajasoluun, tai makrofagiin.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, 30 t u n n e t t u siitä, että mainittu antigeeni on antigeeni, jolle on tunnusmerkillistä se, että se on molekyyli, jonka koko on noin 24, 28, 39, 41, 55, 65, 49 tai 52 kilodaltonia.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, 35 t u n n e t t u siitä, että mainittu vasta-aine on

peräisin jatkuvasta hybridisolulinjasta, jolla on jatkuvan hybridisolulinjan 3D8, 3F7, 3G12, 2A11, 4G2, 1E2, 3G8 tai 1C11 tunnuspiirteet.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
5 t u n n e t t u siitä, että mainittu vasta-aine on kytketty merkkiaineeseen.

9. Immuunimääritysmenetelmä AIDS-virukseen liittyvän infektion osoittamiseksi isännässä, t u n n e t t u siitä, että yhdistetään isännästä peräisin olevaa elimistön nestettä monoklonaaliseen vasta-aineeseen, joka
10 sitoutuu antigeeniin, jota on läsnä vain mainitun infektion läsnä ollessa, ja tutkitaan yhdistelmästä immuunikompleksien läsnäolo, jotka koostuvat mainitusta antigeenista ja mainitusta vasta-aineesta, sillä ehdolla,
15 että kun mainittu antigeeni on virusgeenituote, mainittu immuunikompleksi koostuu mainituista monoklonaalisista vasta-aineista ja infektoiduilla soluilla olevasta mainitusta antigeenista.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että mainittu monoklonaalinen vasta-aine sitoutuu liukoiseen antigeeniin.

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että mainittu AIDS-virukseen liittyvä infektio on AIDS, ARC, PGL tai LAD.

25 12. Vasta-aine, jolla on kyky sitoutua ihmisen HTLV-III-infektion seurauksena muodostuvaan antigeeniin, t u n n e t t u siitä, että mainittu antigeeni on liukoinen seerumiantigeeni tai lymfosyyttiin sitoutunut antigeeni sillä ehdolla, että kun mainittu antigeeni on
30 liukoinen, se ei ole virusgeenituote.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen vasta-aine,
t u n n e t t u siitä, että se on monoklonaalinen vasta-aine, joka on edullisesti peräisin jatkuvasta hybridisolulinjasta, jolla on solulinjan 3D8, 1E2 tai 3G12 tunnuspiirteet.
35

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että se on kytetty merkkiaineeseen, joka on edullisesti entsyymi, radioisotooppi, hiukkanen, alusta, kromogeeni, kemiluminesoiva aine, fluoresoiva aine, koentsyymi, vapaa radikaali tai bakteriofagi.

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että mainittu vasta-aine on HTLV-III-virusgeenituote tai sitoutunut sellaiseen.

16. Diagnostinen välineistö, t u n n e t t u siitä, että se sisältää pakatussa yhdistelmässä monoklonaalista vasta-ainetta, jolla on kyky sitoutua AIDS-ia aiheuttavan virusinfektion seurauksena muodostuvaan antigeeniin, tai mainitun vasta-aineen leimattua johdosta, jolloin mainittu antigeeni on sitoutuneena virusgeenituotteeseen tai lymfosyyttiin mainitun infektion seurauksena.

17. Ainekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää

- (a) HTLV-III-geenituotteen johdokseen sitoutuvan monoklonaalisen vasta-aineen ja
- (b) mainitun geenituotteen johdannaisen yhdistelmää.

18. Ainekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää

- (a) monoklonaalisen vasta-aineen, jolla on kyky sitoutua soluun sitoutuneeseen antigeeniin, joka on muu kuin HTLV-III-geenituote ja jota syntyy HTLV-III-infektion seurauksena, ja
- (b) mainitun antigeenin yhdistelmää.

19. Monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että sillä on monoklonaalisen vasta-aineen ominaispiirteet, jota vasta-ainetta saadaan jatkuvasta hybridisolulinjasta jolla on solulinjan 3D8, 3F7, 3G12, 2A11, 4G2, 1E2, 3G8 tai 1C11 tunnuspiirteet.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer*Uutustilasta ei ole tehty.*

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

2.1.92 P. A. K.

Allekirjoitus