



9500695

24.03.1

/96

## **KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Budapest

### **Diagnosztikai szer és eljárás HIV-fertőzött egyének azonosítására és a terápia követésére**

A találmány diagnosztikai szerre, valamint egy új eljárásra vonatkozik, amely alkalmas HIV fertőzött egyének azonosítására és a terápia követésére. Az eljárás alkalmazható továbbá mint egy helyettesítő szer a HIV ellenes terápiás szerek hatásosságának kimutatására.

A humán immunhiány vírus (Human Immunodeficiency Virus (HIV, ismert mint HTLV III és Lymphadenopathy virus vagy LAV) által okozott fertőzések aránya fokozatosan terjed a világban. A HIV vírus az egyik kiváltója az AIDS-nek (Acquired Immunodeficiency Syndrome), valamint az AIDS-kapcsolatos komplex (ARC) betegségnek, ami az AIDS egyik előzetes stádiuma. Bár az AIDS fertőzések szintje az Egyesült Államokban és a nyugati világban kiegyenlítődt, a növekedés a harmadik világhoz tartozó országokban, és különösen Afrikában fokozatosan nő.

Jelenleg a HIV fertőzött egyének azonosítása a HIV-re specifikus antigének és antitestek meghatározásával történik a testfolyadékokból. Az antitestek normál esetben nem fejlődnek ki egy hétnél korábban a vírusfertőzést követően, előfordul,

Aktaszám: 81163-1940-OE/KmO

hogy 6 hónapon sem fejlődnek ki, sőt, ritka esetben 2 éven belül sem. Így egy igen hosszú időtartam van, amelyen belül nem lehetséges megállapítani, hogy a HIV fertőzés bekövetkezett vagy nem. Továbbá számos körülmény van, amelyek esetében a HIV specifikus antitestek kimutatása nem alkalmazható annak jelzésére, hogy a beteg HIV fertőzött vagy nem.

A jelenleg ismert tesztek a HIV fertőzött egyének kimutatására a HIV specifikus antitestek meghatározásán alapulnak, ezekhez különböző ligandum-alapú eljárásokat alkalmaznak, ilyenek például az enzim-kötött immunoszorbens vizsgálat (ELISA), amelyet eredetileg Gallo és munkatársai fejlesztettek ki 1984-ben [Gallo, R.C. és munkatársai, *Science* 224: 500-502 (1984)]. Mivel a HIV fertőzés diagnosztizálása igen lesújtó, a kezdeti pozitív teszt eredmények után a HIV fertőzést még Western Blot analízissel is igazolni kell a HIV-specifikus antitestekkel kapcsolatban. Egy új módszer ezen igazolásra a virális genom jelenlétének kimutatása polimeráz láncreakció analízissel (Polymerase Chain Reaction (PCR)) [DeRossi, A. és munkatársai, *Lancet* 2: 278 (1988)]. Ez az igazolás a vizsgálati tesztet követően tízszer drágább azonban, mint az eredeti vizsgálat. Továbbá a PCR analízis kivitelezése nagyobb szakértelmet, kényesebb anyagokat igényel, és változásokat idézhet elő, ha nem szigorúan ellenőrzött körülmények között végzik. Ezért a PCR analízist igen ritkán alkalmazzák a HIV fertőzés kezdeti kimutatására, ha egyáltalán alkalmazzák.

Továbbá vannak olyan körülmények, amikor a HIV specifikus antitestek kimutatása nem informatív, és nincs megelőző tudományos alap a jelenleg alkalmazott szűrő vizsgálatokhoz.

Az ilyen korlátozó körülményeket, amelyek esetén ez a szituáció fennáll vagy fennállhat, a következőkben foglaljuk össze.

Például a HIV-fertőzött anyák gyermekei rendelkezhetnek az anyától származó HIV-specifikus antitestekkel, de ezeknek csak 30-50 %-a tényleges HIV-fertőzött és fejlődik ki a fertőzés AIDS-betegséggé (Blanche, S. és munkatársai, N. Eng. J. Med. 320: 1643-1648, 1989). Ugyanúgy, mint a felnőtteknél, itt is a PCR és/vagy a HIV-specifikus antitestekre vonatkozó vizsgálatokat alkalmazzák arra, hogy az anyától származó antitestekkel rendelkező gyermekeket megkülönböztessék a fertőzött babáktól. A pozitív eredményt bármelyik eljárásnál elfogadják, mint a fertőzés bizonyítékát, de a negatív eredmény nem definitív (Borkowsky, W. és munkatársai, Lancet 1: 1169-1171, 1987). További vizsgálat szükséges általában egész addig, amíg: (a) az anyától származó antitestek eltűnnek; (b) a klinikai tünetek kifejlődnek; (c) a T-sejt marker abnormalitásokat bizonyítják; vagy (d) az újszülött eléri a 2 éves kort. Továbbá, mindezen módszerek relatíve költségesek, és mostanáig még nem ismert okokból kifolyólag a PCR módszer nem mindig azonosítja a HIV virális genom jelenlétét az élet első néhány hetében. Összegezve: jelenleg nem lehetséges biztonsággal kimutatni, hogy a HIV-fertőzött anyáktól született gyermekek ténylegesen HIV-fertőzöttek-e, és melyik rendelkezik csupán az anyától származó HIV-specifikus antitestekkel.

Legalább 6 olyan helyzet ismeretes, amikor a HIV-specifikus antitestek meghatározása nem informatív. Mindegyik ilyen esetben egy új diagnosztikai módszer szükséges.

1. Mint azt a fentiekben már említettük, a HIV-fertőzött anyáktól született gyermekek kiszűrése.

2. A nagy rizikójú esetek előfordulását követően azonnal, a HIV-specifikus antitestek kifejlődését megelőzően, ilyenek például az esetleges HIV-szennyezettől származó tűszűrés.

3. Kiegészítésként a transzfúzió céljára alkalmazott teljes vér vizsgálatánál vagy a vértermékek előállításánál. Bár minden adományozott vért jelenleg megvizsgálják, mielőtt azt transzfúzióhoz alkalmazzák, a vizsgálati eljárás a HIV-specifikus antitestekre vonatkozik, ehhez ELISA és Western Blot analíziseket alkalmaznak. Amennyiben a donornál még nem fejlődtek ki az antitestek (azaz szerokonvertáltak), és az mégis HIV-fertőzött, a betegség átvihető (Ward, J.W. és munkatársai, New England Journal of Medicine 318: 473-478, 1988). Továbbá, az utóbbi időkben a szerv befogadók között is találtak HIV-fertőzöttet. Ez úgy fordulhat elő, hogy a szerv donor HIV-fertőzött, de még nem voltak kifejlődve a HIV-specifikus antitestek, és nem volt ismert, hogy valamelyik nagy rizikójú csoporthoz tartozik (hím homoszexuálisok, intravénás drog fogyasztók vagy hemofiliások).

4. A HIV-fertőzött betegek azonosítása az immunizáció után. Ha egy HIV vakcinát alkalmaznak, nem lehetséges megkülönböztetni azokat az egyedeket, akiket vakcináltak, azoktól, akik ténylegesen HIV-fertőzöttek. Másik módszer a vér tartalékok vizsgálatára szintén szükséges.

5. Új terápiás szerek azonosítása és a hatásosságuknak kimutatása a terápiánál, mint végpont helyettesítő. Jelenleg az

ilyen kimutatást a beteg immun működésének analizálásával kell elvégezni (lásd alább).

6. A tudományos kutatásokhoz, más HIV-fertőzött fajok azonosítására. Így például a vakcina vizsgálatokat jelenleg állati modellekből kiindulva végzik. Vakcinálás után az állatokat HIV-fertőzésnek teszik ki, és a fertőzést egy bizonyos időn át követik. Azonban mivel az összes állat rendelkezik a vakcinák által indukált antitestekkel és más antitestek is kifejlődhetnek a HIV fertőzés következtében, a HIV-specifikus antitesteken alapuló technikákat nem alkalmazhatják a vakcinák hatásosságának kimutatására. Hasonlóképpen az új terápiás szereket állati modelleken vizsgálják, továbbá a hatásosságot nem lehet meghatározni egyszerű ELISA-módszerrel, vagy enzim immun vizsgálattal (EIA) vagy más, a HIV-specifikus antitestekre és antigénekre vonatkozó vizsgálattal, mivel az összes állat fertőzött és rendelkezik ilyen antitestekkel és antigénekkel.

A HIV-fertőzött egyéneknél az AIDS kialakulását jelenleg a limfocita T-sejt markerek kimutatásával végzik. A T-4 antigéneket tartalmazó limfociták (ezt CD4-ként is ismerik) mennyisége normál (nem fertőzött) egyedeknél nagyobb, mint a megfelelő, T-8 antigéneket tartalmazó sejteké (ezt CD8-ként is ismerik). A fertőzés idején és részben az aszimptomatikus időszakban a T-sejt markerek általában a normál határok között vannak. Csak olyan HIV fertőzés esetén, amelyik AIDS-szé alakul, fordul meg ez az arány. Ha a T-4 sejtek száma 400/ml érték alá esik, a legtöbb beteg esetében klinikailag kimutatható az AIDS. Egy másik hiányosság is van az AIDS kialakulására vonatkozó tünetekkel és eseményekkel kapcsolatos ismereteinkben a HIV fer-

tőzés aszimptomatikus állapotában. Jelenleg a  $\beta$ -2 mikroglobulin magas szintje esetén ritkán prognosztizálnak (Mossi, A.R. és munkatársai, AIDS 3: 55-61, 1989), holott ennek magas szintje a vizelet és szérum neopterinben (egy folsav metabolit) HIV-fertőzött egyedeknél mutatható ki, és ez a szint növekszik, ha az AIDS kifejlődik (Fuchs, D. és munkatársai, Immunology Today 9: 150-155, 1988). Így, bár a teljes okozati összefüggés nem mutatható ki, bármelyik komponens meghatározását javasolták az AIDS-et prognosztizáló jelként, de egyik sem alkalmazható a HIV fertőzések korai kimutatására, mivel az előzőekben említett koncentráció változások csak egy, a fertőzést követő szignifikáns időn belül következnek be.

Ami a szakterületen szükséges, az egy új módszer annak meghatározására, hogy a beteg HIV-fertőzött-e a fenti körülmények között, amelyek esetén a HIV specifikus antitestek analízise nem kellőképpen informatív.

A fentieknek megfelelően a találmányunk célja a HIV-fertőzött egyedek azonosítására alkalmas módszer kifejlesztése.

A találmányunk célja továbbá olyan módszer kifejlesztése a HIV-fertőzött egyedek azonosítására, amely olyan körülmények között is alkalmazható, amikor a HIV-specifikus antitestek kimutatása nem informatív vagy nem praktikus.

A találmány célja továbbá diagnosztikai szer biztosítása, amely helyettesítő végpontként alkalmazható a HIV-fertőzött egyedek terápiájánál.

A fenti célokat megvalósíthatjuk azáltal, hogy felismertünk egy új faktort, amely emlősök szérumában van jelen, és amely-

nek koncentrációja megváltozik 1 - 3 nappal a HIV fertőzés be-  
következése után. Ez egy igen fontos felismerés, annyiban,  
hogy vannak FDA-elfogadott kezelések HIV-fertőzött egyének  
számára, ilyenek például az azidotimidin (AZT vagy  
Zidovudine), vagy didezoxi-inozin (DDI) anyagokkal végzett ke-  
zelések, amelyek fokozhatják a HIV-fertőzött betegeknél az im-  
munológiai funkciókat és lényegesen késleltetik az AIDS-szel  
kapcsolatos betegségek kifejlődését. Ily módon, minél előbb le-  
het a HIV-fertőzés jelenlétét kimutatni, annál korábban lehet az  
ilyen terápiát megindítani (New England Journal of Medicine  
326: 1037-1042, 1990).

A fentiek alapján a találmány vonatkozik egy, a HIV-  
-fertőzés azonosítására alkalmas eljárásra oly módon, hogy  
meghatározzuk a C-8.2 mennyiségét a betegől származó vér-  
ben vagy vér frakcióban, és az adott beteget HIV-fertőzöttnek  
minősítjük, ha az említett, a betegől származó vérben vagy vér  
frakcióban a C-8.2 mennyisége statisztikusan különbözik a  
kontroll, nem-HIV-fertőzött csoportból származó vérben vagy  
vér frakcióban meghatározott C-8.2 mennyiségétől.

A találmány vonatkozik továbbá egy izolált foszfolipidre,  
amelynek retenciós ideje amino-szénhidrát HPLC oszlopon kb.  
8,2 perc acetonitril gradiens alkalmazásával, az abszorpciót  
210 nm hullámhossznál meghatározva.

A találmány vonatkozik továbbá HIV-fertőzött egyének azo-  
nosítására, oly módon, hogy a betegől vért vagy vérmintát ve-  
szünk, meghatározzuk a mintában a C-8.2 mennyiségét, össze-  
hasonlítjuk a meghatározott C-8.2 mennyiségét egy korban azo-  
nos, nem HIV-fertőzött kontroll egyén vérmintájával, és az adott

beteget HIV-fertőzöttnek minősítjük, ha a tőle származó mintában a C-8.2 mennyisége statisztikusan különbözik a kontroll csoportnál meghatározott C-8.2 mennyiségétől.

A találmány vonatkozik továbbá HIV-fertőzött humán betegeknél a kezelés hatásosságának meghatározására oly módon, hogy a betegtől a kezelést megelőzően vért vagy vér frakció mintát veszünk, meghatározzuk a mintában a C-8.2 mennyiségét, vért vagy vér frakció mintát veszünk a betegtől a kezelés ideje alatt vagy a kezelést követően és meghatározzuk a C-8.2 mennyiségét e mintában is, majd összehasonlítjuk a kezelés előtt vett mintában meghatározott C-8.2 mennyiségét a kezelés alatt vagy a kezelést követően vett mintában meghatározott C-8.2 mennyiséggel és a kezelést hatásosnak minősítjük, ha a kezelést megelőzően vett mintában meghatározott C-8.2 mennyisége statisztikusan különbözik a kezelés alatt vagy a kezelést követően vett mintában meghatározott C-8.2 mennyiségétől.

A találmány vonatkozik továbbá HIV-fertőzött betegek azonosítására oly módon, hogy a betegtől szérumból mintát veszünk, meghatározzuk a szérumból a C-8.2 mennyiségét, összehasonlítjuk a szérumból meghatározott C-8.2 mennyiségét a hasonló korú, kontroll, azaz nem-fertőzött csoportba tartozó egyéntől vett szérumból jelenlévő C-8.2 mennyiségével, és a beteget HIV-fertőzöttnek minősítjük, ha a betegnél a C-8.2 mennyisége statisztikusan különbözik a kontroll, nem HIV-fertőzött csoportból származó szérumból meghatározott C-8.2 mennyiségétől.

A fentieket és a találmány egyéb szempontjait részletesebben a következő leírással, igénypontokkal és rajzokkal illusztráljuk.

Az 1. ábrán bemutatjuk a HPLC analízis eredményét egészséges egyed szérumból vett minta esetén.

A 2. ábrán bemutatjuk egy HIV-fertőzött betegtől vett szérumból HPLC analízisét, amelynél a C-8.2 szint alacsony.

A 3. ábrán bemutatjuk egy HIV-fertőzött betegtől vett szérumból HPLC-analízisét, amelynél a C-8.2 szint magas.

A 4. ábrán bemutatjuk egy HIV-fertőzött anyától született nem-HIV-fertőzött újszülött esetén a C-8.2 szintet HPLC analízissel meghatározva.

Az 5. ábrán bemutatjuk egy HIV-fertőzött anyától született HIV-fertőzött újszülött esetén a C-8.2 szintet HPLC analízissel meghatározva.

A 6. ábrán mutatjuk a C-8.2 ultraviola spektrográfiai analízis eredményét.

A 7a. és 7b. ábrákon bemutatjuk a találmány szerinti eljárással amino-szénhidrát oszlopon elválasztott 25 frakció Fourier transzformációs infravörös analízisét (Fourier Transform Infrared, FTIR).

A 8. ábrán látható a lipid standardok FTIR analízis eredményei.

A 9. ábrán bemutatjuk a találmány szerinti eljárással amino-szénhidrát HPLC oszlopon elválasztott 24 frakció gyors atombombázásos tömegspektrum analízisének eredményét (Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy, FAB-MS).

A 10. ábrán látható a szfingozil-foszforil-kolin FAB-MS analízisének eredménye.

A 11. ábrán látható a találmány szerinti eljárással normál egyedek mintáiból amino-szénhidrát oszlopon elválasztott 25 frakció FAB-MS analízise.

A 12. ábrán látható a foszfatidil-kolin (lecitin) FAB-MS analízise.

A leírás során hivatkozott szabadalmi bejelentések, szabadalmak és irodalmi helyek teljes egészükben hivatkozásként szolgálnak. Amennyiben valami nem egyértelműség mutatkozik, a jelen leírás és az abban alkalmazott definíciók a döntők.

Azt találtuk, hogy az új vegyület, amelyet C-8.2-ként jelölünk, és amely elválasztható, kimutatható és/vagy mennyiségi-  
leg meghatározható (a nem korlátozó példák szerint) HPLC segítségével, koncentrációját illetően akut változáson megy keresztül röviddel a HIV-fertőzés után, és az alkalmazható a HIV-fertőzött egyedek azonosítására szolgáló eljárásban.

A "röviddel a HIV-fertőzés után" kifejezés 1 - 3 napot jelent a HIV-fertőzést követően.

Azt találtuk, hogy a C-8.2 jelen van humán egyedek, sertések, macskák, patkányok és egerek szérumában, és úgy gondoljuk, hogy az emlősök szérumának komponense.

A "vér frakció" kifejezés szérumot vagy plazmát jelent.

A szérum neopterin vagy  $\beta$ -2 mikroglobulin koncentrációjának meghatározását ugyanolyan célból javasolták, mint a jelen találmány. Azonban a következőkben ismertetett eljárások különböznek a fentiekben említett kísérletektől a következőkben: (1) a C-8.2 ultraviola spektruma nem tartalmazza a pteridin gyű-

rú karakterisztikus abszorpcióját, amely jellemző a neopterinre; (2) a C-8.2 infravörös spektruma nem konzisztens a pteridin gyűrű jelenlétével; (3) a neopterin koncentrációja nem változik a HIV-fertőzést követő napokban, mint ahogy változik a C-8.2 koncentrációja; és (4) a  $\beta$ -2 mikroglobulin egy protein, amelynek oldhatósága és fizikai tulajdonságai különböznek a C-8.2 tulajdonságaitól. Ezzel szemben a C-8.2-t mint foszfolipidet vagy különböző foszfolipidek keverékét azonosítottuk és összehasonlítottuk autentikus anyagokkal Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiával (FTIR), ultraviola spektroszkópiával (UV), Fast Atom Bombardment-Mass Spectroscopy (FAB-MS), valamint a HPLC retenciós időekkel, mint azt a következőkben ismertetjük. Így a C-8.2 különbözik a  $\beta$ -2 mikroglobulintól, amely egy protein, és különbözik a neopterintől, amely egy pteridin metabolit. Mivel sem a  $\beta$ -2 mikroglobulin, sem a neopterin koncentráció nem reagál gyorsan a HIV fertőzés megjelenésére, egyiknek a meghatározása sem alkalmazható a HIV-fertőzött egyedek azonosítására, mint ahogy alkalmazható a C-8.2 meghatározása. Így az itt ismertetett meghatározás a C-8.2 mennyiségére vonatkozóan, amely egy diagnosztikai indikátor a HIV fertőzésre, nem tartható a jelen szakterületen jártas szakember ismeretéhez.

A leírás során a találmány szerinti marker vegyületet "C-8.2" anyagként jelöljük. Meglepetésszerűen azt tapasztaltuk, hogy a C-8.2 egy szfingomyelin és annak valamely származéka. A szfingomyelin származékai közé tartoznak a korlátozás szándéka nélkül például a következők: ceramidok (szfingomyelin a foszfokolin csoport nélkül) és a szfingozil-foszfofolin

(szfingomyelin acil-amid-csoport nélkül). A C-8.2 és a szfingomyelin azonos anyagokat jelentenek a leírás során.

Emlősöknél a HIV-fertőzés státuszának meghatározása érdekében meghatározzuk a vérplazma, előnyösen a szérum mintában a C-8.2 koncentrációját. A C-8.2 szint meghatározását végezhetjük HPLC analízissel, ligandum-bázisú módszerrel, vagy más meghatározott módszerrel, amely ismert a szakterületen jártas szakember számára. Mindegyik esetben a meghatározott koncentráció értéket egy azonos korú (vagy fajú) normál egyed mintájához hasonlítjuk. A statisztikusan szignifikáns érték, legyen az akár a normál szint alatt vagy felett, diagnosztizálja a HIV-fertőzést.

Azt találtuk, hogy a kimutatható C-8.2 mennyisége változik az egyed korával. A gyakorlatban a találmány szerinti eljárás kivitelezésénél a mintában kimutatható C-8.2 mennyiséget korban azonos kontroll csoporthoz viszonyítottuk. A kontrollokat a következő csoportokba oszthatjuk: 0 (újszülött) - 23 hónap; 2 év - 17 év; és 18 év felett.

A találmány szerinti megoldás különlegessége nem a C-8.2 koncentrációjának meghatározására vonatkozó eljárás, hanem az a felismerés, hogy a C-8.2 koncentrációja a HIV-fertőzés során igen korán megváltozik, és így a C-8.2 szintje, összehasonlítva a bármilyen módszerrel meghatározott normál szinthez, alkalmazható a HIV-fertőzés felismerésére.

Nyilvánvaló, hogy a nem-humán egyedekből származó szérum analízálásakor mind a HIV vírus, mind a HIV-vel összemérhető vírusok, amelyek az adott fajra specifikusak, azonos perturbációt váltanak ki a C-8.2 koncentrációjában, mint amit a

humán HIV-fertőzötteknél találtunk. Így például főemlősök (például majmok) esetén a Simian Immunodeficiency Virus (SIV) fertőzés ugyanolyan módszerekkel mutatható ki, mint amilyeneket a későbbiekben humán egyedeknél a HIV fertőzésnél alkalmazunk.

A C-8.2 a görbe csúcsát jelenti, amelyet HPLC analízissel vettünk fel acetonitril gradiens, mint eluens alkalmazásával 8,2 perces elúciós időnél, miután az extrahált szérummintát az oszlopra vittük. Ez a fő csúcs, amely a kromatogramon jelen van. A C-8.2 fizikai jellemzői a következők: egy foszfolipid vagy rokon foszfolipidek keveréke, a retenciós ideje kb. 8,2 perc, amino-szénhidrát oszlopon kromatografálva acetonitril gradiens felhasználásával, az abszorpciót 210 nm-nél vagy ennél rövidebb hullámhosszúságon mérve. Mint az a 4. példából kitűnik, a C-8.2-t mint szfingomyelint és annak származékait azonosítottuk. Ezek a fizikai tulajdonságok igazolják az azonosságot.

A találmány szerinti eljárás alkalmazásával a HIV fertőzés pozitíven diagnosztizálható, ha a C-8.2 szintje lényegesen magasabb vagy alacsonyabb (azaz statisztikusan különbözik), a korban (és fajban) azonos kontroll csoporttól. A "lényegesen magasabb vagy alacsonyabb" vagy "statisztikusan különböző" kifejezések azt jelentik, hogy a különbség három standard deviáció (eltérés) az egészséges kontroll csoport (nem HIV-fertőzött kontroll csoport) esetén meghatározott átlag fölött vagy alatt. Az ilyen standard eltérést a szakterületen jártas szakember számára ismert statisztikai módszerekkel lehet meghatározni. A kontroll vizsgálatokat nem kell szükségszerűen egyidejűleg végezni minden vizsgálattal. A normál (kontroll) in-

tervallum meghatározható egyszer mindegyik beteg populációra vagy csoportra (mint azt a fentiekben említettük), és mindegyik vizsgálat eredményét hasonlítjuk a meghatározott értékekhez.

A találmány szerinti eljárásnál a feltételezett HIV-fertőzött betegtől vér frakciót, például szérum mintát veszünk. A minimális szérum minta mennyisége az analízis céljára 0,10 ml. A szérumot szerves oldószerrel, így például metanollal, etanollal, tetrahidrofuránnal, kloroformmal, előnyösen acetonitrillel extraháljuk, 2 - 5:1 (szerves oldószer : szérum), előnyösen 4:1 arányban. Az extraktumot ezután centrifugáljuk a szerves és víz-fázis elválasztására, például 750 x g mellett 5 percen át 2 - 4 °C közötti hőmérsékleten. A szerves fázist tartjuk meg, ez tartalmazza a C-8.2 anyagot.

A fentiek szerint nyert szerves fázisból a C-8.2 meghatározását - a korlátozás szándéka nélkül - végezhetjük például HPLC analízissel vagy előnyösen antitest-alapú vizsgálattal, mint azt a 2. példában ismertetjük. Az antitest-alapú vizsgálatok előnyökön könnyű kivitelezhetőségük alapján, valamint azért, mivel nem igényelnek kényes berendezéseket.

Számos eljárást fejlesztettek ki egy specifikus antitest és tracer felhasználására, valamint a ligandumok mennyiségi meghatározásához. Radioimmuno vizsgálat céljára dextrán-bevonatú csontszén alkalmazható a nem megkötött tracer abszorpciójához, és ily módon lehetővé válik a megkötött frakció meghatározása. Más módszernél, (a) a megkötött frakciót egy második antitesthez való kötéssel (IgG specifikus) választjuk el vagy oldatban, vagy úgy, hogy kémiaiag gyöngyökhöz kötjük; (b) polietilén-glikolt vagy ammónium-szulfátot adagolhatunk a

megkötött és szabad tracer elválasztásának fokozására; vagy (c) egy bevonatos cső módszert alkalmazhatunk a kötött és szabad tracer elválasztásához. A radioimmuno vizsgálaton túlmenően a foszfolipid mennyiségét meghatározhatjuk immunoradiometriás vizsgálattal (Immunoradiometric assay (IRMA) [Miles, L.E.M. és munkatársai, Lancet 2: 492 (1968)], enzim immunovizsgálattal (enzyme immunoassay (EIA) [Berry, N.J. és munkatársai, J. Virol. Met. 34: 91-100, (1991)] és ELISA vizsgálattal [Engvall, E. és munkatársai, G. Immunochemistry 8: 871 (1971)], továbbá alkalmazhatunk bármilyen, a szakterületen jártas szakember számára ismert ligandum vizsgálati módszert is.

A találmány szerinti eljárásnál felhasználható HPLC oszlopok közé tartoznak például a következők: Adsorbosphere - NH<sub>2</sub> (Alltech, Chicago, IL), Econosil - NH<sub>2</sub> (Alltech), Lichrosorb - NH<sub>2</sub> (Alltech), SEPHADEX™-LH20 (Pharmacia, Piscataway, NJ), előnyösen Amino Carbohydrate (Alltech). A kapott kromatogramokat összehasonlítjuk a korban (és fajban, ahol szükséges) azonos kontroll csoportéval. Bármelyik érték, amely három standard eltéréssel a kontroll érték alatt vagy felett van, jelzi a HIV-fertőzés meglétét.

A felhasználásra kerülő oldószert bármelyik fentiekben említett HPLC oszlopnál a C-8.2 detektálásához és mennyiségi meghatározásához állítjuk be. Így például, ha amino-szénhidrát oszlopot alkalmazunk, az alkalmas komplex gradiens például a következő: t = 0 perc (az idő a minta oszlopra felvitele utáni érték), 95 % acetonitril; t = 2 perc, 75 % acetonitril; t = 10 perc, 55 % acetonitril; t = 12 perc, 40 % acetonitril; t = 14 perc és t =

15 perc, 95 % acetonitril (eluálás). Ha más, valamely fentiekben említett vagy más egyéb ekvivalens affinitásos oszlopot alkalmazunk, a kötési, mosási és elúciós gradienst rutin kísérlettel határozhatjuk meg a C-8.2 fizikai tulajdonságai alapján, ezek a kísérletek a szakterületen jártas szakember számára ismertek.

Mint azt a következőkben ismertetjük, a HIV-fertőzött egyének esetén a C-8.2 szintek visszatérnek a normál szintre az AZT, ddl vagy ddC terápia megkezdésével, ha a terápia hatásos. Mint azt a későbbiekben is leírjuk, négy HIV-fertőzött, 4 - 11 éves gyermek eseténél neurológiai diszfunkciót tapasztaltunk, ami tipikus a HIV-fertőzésre. Mindegyik fertőzött gyermek esetében statisztikusan szignifikáns mértékben megnövekedett C-8.2 szérum szintet tapasztaltunk HPLC analízissel meghatározva. Mindegyik gyermeknek AZT-t adagoltunk a betegség szimptomáinak leküzdésére. Az AZT terápia hatástalan volt mind a négy gyermek esetében, és a C-8.2 szint nem változott. Azonban nyolc hasonló korú gyermeknél, akik szintén HIV-fertőzöttek voltak, az AZT terápia hatásos volt, és a C-8.2 szint visszatért a normál értékre. Ily módon a C-8.2 szintek meghatározása alkalmazható az anti-HIV terápiás szerek hatásosságának kimutatására.

Ha egy anti-retrovirális hatóanyaggal (például AZT, ddl, ddC vagy ezek keverékével) végzett kezelés hatásosságát akarjuk kimutatni, a C-8.2 szintek meghatározását az ilyen terápia alatt vagy azt követően végezzük. A kimutatott szinteket a terápia megkezdése előtt meghatározott szinthez hasonlítjuk. Így ha a C-8.2 szint nem tér vissza a hasonló korú kontroll csoportnál meghatározott szinthez, a terápiás kezelést meg lehet

szakítani. Ez egy igen fontos felismerés, mivel minden anti-HIV terápiás szer igen nagymértékben toxikus, és ha az nem hatásos, olyan hamar abba kell hagyni, amilyen hamar csak lehet.

A szérum extraktum analízis céljára való előállításához alkalmas a vér vagy a plazma. Nagyobb vagy kisebb mennyiséget lehet alkalmazni annak megfelelően, hogy a fentiekben említett relatív arányt tartani tudjuk. A HIV átvitel veszélye miatt abból kell kiindulni, hogy mindegyik humán anyag HIV-fertőzött beteg-től származik, és a vér vagy szövetminták kezelését igen nagy elővigyázatossággal kell végezni.

Azon túlmenően, hogy a C-8.2 jelzi a HIV fertőzést, az abnormalis eltérés azonosítása és az eltérés adott összefüggése a vírus fertőzéssel felhasználható helyettesítő végpontként vagy a beteg fertőzöttségi mértékének vagy egészségi állapotának meghatározására a betegnél alkalmazott terápia hatásosságának jelzésére.

Anélkül, hogy bármilyen teóriához kötődnénk, úgy gondoljuk, hogy ahhoz, hogy a C-8.2 szintek közvetlenül a HIV-fertőzést követően gyorsan változzanak, kell hogy legyen egy C-8.2-specifikus hidrolitikus vagy szintetizáló enzim, amelynek aktivitása a HIV-fertőzés hatására megváltozik. Ez a feltételezett enzim része lehet a folyamatnak, amelynél a sejt mechanizmus felborul a vírus által. E folyamat blokkolása megakadályozhatja, hogy a vírus a sejt működésbe beleszóljon. Így az ilyen enzim meglétének felismerése felhasználható egy esetleges új cél azonosítására a HIV-specifikus kemoterápiához.

A találmány szerinti vizsgálatok a C-8.2 szintek megváltozásán, és nem a vírus antigén tulajdonságán alapulnak. Így

bármely humán immunhiányos vírus (HIV-1, HIV-2, stb.) kimutatható ezen vizsgálatok segítségével, és ugyancsak kimutathatók ezek bármely antigén variánsai. A találmány szerinti, a HIV fertőzés kimutatására alkalmas eljárás egyik előnye az, hogy képes bármely HIV vírust kimutatni, függetlenül annak antigén felépítésétől. Ez egy megkülönböztető előny, mivel a HIV-ről kimutatták, hogy igen nagymértékben mutagén. Ha a vírus változik, nem szükséges új reagens a találmány szerinti eljárás gyakorlatban való kivitelezéséhez.

A HIV nem stabil szerves oldószerekben. A fentiekben ismertetett oldószer extrakciós módszer (a) inaktiválja a szabad HIV részecskéket, és (b) szétrombolja a HIV-fertőzött sejteket. Ezek azok a szerek, amelyek révén a HIV-fertőzés átvihető. Ily módon ezen eljárás alkalmazása csökkenti a veszélyt a vizsgálatot kivitelező személy számára.

A C-8.2 egy foszfolipid vagy különböző rokon foszfolipidek keveréke az FTIR vizsgálat alapján, mint az a 8a. és 8b. ábrából kitűnik, mivel a 9. ábrán bemutatott lipid standardok specifikus sávjai szintén jelen vannak a C-8.2 anyagban.

Az 1. példában leírjuk a HPLC alkalmazását a C-8.2 koncentrációk gyors meghatározásához. A 2. példában ismertetjük a C-8.2 meghatározáshoz szükséges ligandum-specifikus anyagokat és eljárásokat. A 3. példában ismertetjük a normál felnőttektől nyert C-8.2 előzetes jellemzését.

A találmányt a továbbiakban a közelebbi példákkal illusztráljuk, ezek azonban semmiképpen sem korlátozzák az oltalmi kört.

## 1. példa

### **C-8.2 szintek meghatározása HPLC alkalmazásával**

0,1 ml szérumot 0,4 ml acetonitrillel extrahálunk szobahőmérsékleten egy 12 x 75 mm méretű üvegcsőben. Az extraktumot 2 - 4 °C hőmérsékleten 5 percen át 750 x g mellett centrifugáljuk. Az extraktumot egy 1 ml-es fecskendővel eltávolítjuk, a fecskendőt egy szűrőhöz csatlakoztatjuk (0,45 mikron, LC13 Acrodisk, Gelman Laboratories, Ann Arbor, MI), és az extraktumot szűrjük. A szűrletet egy alkalmas üvegfiolában felfogjuk. Ha szükséges, ez a fiola lehet egy a HPLC berendezéshez tartozó mintatartó fiola.

### **HPLC analízis**

A HPLC vizsgálatához (Model 401T, BioRad, Richmond, CA) amino-szénhidrát oszlopot (4,6 x 250 mm; Alltech, Chicago, IL) alkalmazunk. A mintát komplex gradienssel acetonitril és víz elegyével végezzük: (1) t = 0 perc, 95 % acetonitril; (2) t = 2 perc, 75 % acetonitril; (3) t = 10 perc, 55 % acetonitril; (4) t = 12 perc, 40 % acetonitril; (5) t = 14 perc, 40 % acetonitril; (6) t = 15 perc, 95 % acetonitril. A kromatogramról eluált anyagokat ultraviola abszorpcióval mutatjuk ki 210 nm-nél. A csúcs alatti területet és a magasságot computer software csomaggal (BioRad) határozzuk meg. Mind a magasság, mind a terület (terület integrációs egységekben - AU) arányos a bevitt extraktum mennyiségével. A normál értékeket mindkét paraméterrel meghatározhatjuk.

### **Eredmények: felnőttek**

A normál (nem-HIV-fertőzött) felnőttektől vett szérumot a fentiek szerint extraháljuk és kromatografáljuk. A mindkét nem-

ből származó normál felnőttek esetén (n = 14) a C-8.2 koncentráció értékek normál-eloszlást mutattak átlagosan 38 terület egységgel (AU) és 3,5 AU standard eltéréssel. A mintákat normálnak minősítettük, ha azok a 27-48 AU egység közötti intervallumba estek, és abnormálisnak, ha nem estek ezen intervallumba három standard eltérésen, 10,5 AU értéken belül (egy reprezentatív kromatogramot mutatunk be az 1. ábrán). A normál eloszlás alapján a minták 99 %-ának ezen intervallumon belül kell lenni. Az abnormális minták lehetnek alacsonyabbak vagy magasabbak, mint a normál intervallum.

Felnőttek esetén, akikről tudott, hogy HIV-fertőzöttek (n = 19) - ezt HIV-specifikus antitestekkel mutattuk ki -, a szérumban a C-8.2 mennyisége 5 - 65 AU közötti érték, az átlag 38 AU; volt néhány minta a normál intervallumon belül (n = 3), és az értékek nem voltak normál eloszlásúak (egy reprezentatív kromatogramot a 2. és 3. ábrákon mutatunk be). Az alábbi táblázatból kitűnik az összefüggés a HIV állapot (specifikus enzim immunvizsgálattal meghatározva) és a C-8.2 érték között, amelyek három standard eltérésen belüli értéket, illetve három standard eltérésen kívüli értéket mutatnak a normál intervallumhoz viszonyítva.

**Első csoport**

**HIV antitestek EIA analízissel kimutatva**

**HIV HPLC-vel kimutatva**

	<b>NEG<sub>c</sub></b>	<b>POS<sub>d</sub></b>
<b>NEG<sup>a</sup></b>	14	3
<b>POS<sup>b</sup></b>	0	16

$$X^2 = 22,9; p < 0,0001$$

- a - C-8.2 koncentráció HPLC-vel meghatározva, a 27-48 intervallumon belül
- b - C-8.2 koncentráció, a 27 - 48 AU intervallumon kívül
- c - HIV negatív szérum EIA-val vizsgálva
- d - HIV pozitív szérum EIA-val vizsgálva
- 1 - khi-négyzet

A fenti eredményekből kitűnik, hogy a találmány szerinti eljárás alkalmas 19 HIV-fertőzött egyed közül 16 azonosítására. Az még kérdéses, hogy vajon a három antitest pozitív beteg közül, amelyek normál C-8.2 szintet mutattak, ténylegesen kifejlődik-e az AIDS egy későbbi időpontban.

#### **Második csoport**

A vizsgálati mintákat (n = 37) a HIV fertőzésre nagy rizikó faktorú felnőtt egyedektől vettük (férfi homoszexuálisok, intravénás drogfüggők vagy ezek szexuális partnerei), és vizsgáltuk a HIV antitestek jelenlétére egy véradó központban. A C-8.2 szintek értéke 28 AU és 48 AU közötti intervallumba esett, a standard eltérés értéke 3,5 AU.

#### **HIV antitestek EIA analízissel kimutatva**

#### **HIV HPLC-vel kimutatva**

	<b>NEG</b>	<b>POS</b>
<b>NEG</b>	13	4
<b>POS</b>	7	13

$$X^2 = 6,36; p < 0,01$$

A fentiekből kitűnik a találmány szerinti eljárás általános alkalmassága a HIV-fertőzött egyének azonosítására.

### **Harmadik csoport**

HTLV 1 vagy 2 fertőzött felnőttektől (n = 10) levett szérum minta legtöbbje (10 közül 8) a minták a normál sávján belül esett (a C-8.2 értékek normál sávja 28 AU és 48 AU között kell hogy legyen, ezen populáció esetén a standard eltérés 3,5 AU). Két minta esetén, amelyeknél a C-8.2 szint a normál intervallumon kívül esett, egy esetben pozitív HIV eredményt kaptunk EIA-val, a másiknál nem, de nem volt további vizsgálat arra vonatkozóan, hogy a beteg vajon a fertőzési periódus után, de az antitestek kifejlődése előtt volt. Az adatokból kitűnik, hogy a C-8.2 koncentrációban bekövetkező változás inkább specifikus a HIV-re, mint más rokon, humán T-sejt limfotropikus vírusra.

### **Negyedik csoport**

Két szero-konverziós panelt vizsgáltunk, hetenként kétszeri mintákkal, az eredményeket az alábbi táblázatban foglaljuk össze. A mintákat két olyan felnőttől vettük, akik nem azonosított "nagy rizikó faktorúak", és akik hozzájárultak a heti kétszeri vérvételhez. Mindegyik esetben az első mintát az eseményt követően 48 órán belül vettük (további információ nincs az esemény természetére és időpontjára vonatkozóan a titkosság megőrzése érdekében). Ezen betegeknél a normál C-8.2 érték 28 AU és 48 AU között kell hogy legyen, a standard eltérés 3,5 AU. Az eredményeket a következő 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. Táblázat

Minta száma	Napok száma	C-8.2 szint		HIV-specifikus antitestek	
		1. beteg	2. beteg	1. beteg	2. beteg
1.	1	25,5	25,1	0	0
2.	4	19,8	15,0	0	0
3.	7	23,5	23,4	+	0
4.	10	24,5	--	++	0
5.	14	26,2	16,1	+++	0
6.	17	30,0	15,0	+++	0
7.	21	24,3	14,8	+++	0
8.	24	25,2	--	+++	0

Mindkét betegnél a C-8.2 kezdeti koncentrációja (az 1. napon) már három standard eltéréssel a normál érték alatt volt, és ezért HIV-fertőzést diagnosztizáltunk. Az első betegnél, amikor a HIV-specifikus antitestek kifejlődtek, a C-8.2 szint visszatért a normál értékre, de az érték nem maradt meg, amikor a fertőzés tovább fejlődött. A második betegnél a HIV-specifikus antitestek nem fejlődtek ki néhány hónap alatt, és a C-8.2 szintnél nem volt megfigyelhető visszatérés. Mindkét betegnél a C-8.2 szintben bekövetkező változás a HIV specifikus antitestek kifejlődését megelőzően következett be.

A fenti adatokból kitűnik, hogy a C-8.2 szint meghatározása a HIV-fertőzött egyének felismerésére alkalmas a nagy rizikójú eseményt követő 3 napon belül, amely esemény HIV fertőzéshez vezethet.

## **Eredmények: HIV antitesttel rendelkező csecsemők**

### **1. csoport: Normál csecsemők**

Normál (nem-HIV-fertőzött) csecsemőknél (kor: 8 nap és 15 hónap között) a C-8.2 szint 18-33 AU közötti érték ( $n = 11$ ), ennek átlaga 25,5 és a standard eltérés 2,5 AU. Ez a normál intervallum, amelyet összehasonlításul használunk a HIV-fertőzésre magas rizikójú csecsemőkhöz. A reprezentatív kromatogramot a 4. ábrán mutatjuk be.

### **2. csoport: 18 hónapos kornál fiatalabb csecsemők**

#### **HIV-fertőzésre nagy rizikófaktorral**

Szérum mintát vettünk nagy rizikófaktorú csecsemőktől (HIV-fertőzött anyától születtek), akik 18 hónapnál fiatalabbak voltak ( $n = 27$ ), és a születéskor HIV-specifikus antitestekkel rendelkeztek, ezek szérumában a C-8.2 szint a normál intervallumon belül volt 15 esetben, és a normál intervallumon kívül 12 esetben. Azon gyermekek esetén, akiknél a C-8.2 értékek a normál intervallumon belül voltak, HIV-fertőzés szimptomái nem voltak kimutathatók, míg a normál intervallumon kívül eső 12 gyermek közül 9-nél a HIV-fertőzés klinikai jelei kimutathatóak voltak, beleértve a lymphadenopátiát. A fennmaradó 3 esetben a végső diagnózis még nem ismert a koruk miatt, bár a szérumban mindegyiknél folyamatosan kimutathatók a HIV-specifikus antitestek. Tipikus kromatogramot mutatunk be az 5. ábrán, az adatokat a következő táblázatban foglaljuk össze.

**18 hónaposnál fiatalabb csecsemők HIV-fertőzésre nagy rizikófaktorral**

**C-8.2 mennyiség HPLC-vel meghatározva**

	Szimptóma nélkül	Szimptómával
Normális <sup>a</sup>	15	0
Abnormális <sup>b</sup>	3	9

$$X^2 = 16,9; p < 0,001$$

Megjegyzések:

- a a C-8.2 koncentráció a 18-33 AU intervallumon belül
- b a C-8.2 koncentráció vagy három standard eltéréssel a 18 alatt, vagy a 33 AU fölött.

**3. csoport: Idősebb csecsemők és gyermekek**

Idősebb csecsemőknél és gyermekeknél, 2 - 11 év között, a C-8.2 koncentráció értékek statisztikusan szignifikánsan növekedtek (azaz legalább három standard eltéréssel) mindegyik HIV-fertőzött egyénnél (n = 4), akiket AZT-vel nem kezeltünk (az eredményeket nem mutatjuk). Az AZT-vel kezelt egyedeknél (n = 16) a C-8.2 értéke a normál intervallumon belül volt 5 esetben, és emelkedett 11 esetben (az eredményeket nem mutatjuk). Ez utóbbi csoportnál folyamatosan kimutathatók voltak neurológiai és viselkedésbeli elváltozások és más neurológiai szimptómák, amelyek jellemzők a HIV-fertőzésekre, míg a normál értékű csoportnál ilyen elváltozás nem volt. Igen fontos, hogy két gyermeknél az egymást követő mintáknál magas C-8.2 szint volt kimutatható az AZT terápiát megelőzően, amely érték

a normál intervallumon belüli értékre csökkent 1 hónapon belül a kezelés megkezdése után.

Összegezve, a C-8.2 meghatározása HIV-specifikus antitestekkel rendelkező csecsemőknél megkülönbözteti azokat a csecsemőket, akiknél az antitestek az anyától származnak, azoktól a gyermekektől, amelyek HIV-vel fertőztek. Továbbá, a C-8.2 szintek jelzésként szolgálnak az AZT terápia hatásosságára vonatkozóan.

**C-8.2 szintek meghatározása az antiretrovirális gyógyszerrel végzett terápia hatásosságának kimutatására**

Négy, 4 - 14 éves HIV-fertőzött gyermeket vizsgáltunk, akiknél a HIV-fertőzésre jellemző neurológiaszintómák jelentkeztek. Ezeknél a C-8.2 koncentrációja a szérumban szignifikáns mértékben megnövekedett értékű volt (40, 41, 44 és 46 AU), összehasonlítva a hasonló korú kontrollokkal (20, 33 AU, n = 11). AZT terápiát alkalmaztunk, de az nem volt hatásos a betegségek szintómáinak csökkentésében, és ezeknél a betegeknél a C-8.2 szintek nem változtak. Azonban nyolc HIV-fertőzött gyerekénél, akiknél a C-8.2 szintek szignifikáns mértékben különböztek a kontroll értékektől, és akiknek ugyanazon AZT kezelést alkalmaztunk, és ez hatásosnak bizonyult, a C-8.2 szintek a normál értékre csökkentek (24 - 34 AU).

Továbbá vizsgáltunk egy 4 éves gyermeket, aki HIV antitestre negatív volt ELISA és Western-blot analízissel meghatározva. Ebben az esetben a C-8.2 érték 41 AU. A gyermek szintomás volt a HIV-fertőzésre és HIV pozitívként diagnosztizáltuk a találmány szerinti eljárással.

## 2. példa

### **Reagensek kifejlesztése ligandum vizsgálathoz, eljárás C-8.2 kialakításához haptenként hordozó proteinhez kötve**

A következőkben eljárást ismertetünk a C-8.2 mennyiségi meghatározására alkalmas ligandum-alapú vizsgálathoz szükséges reagens előállítására.

A C-8.2 zsírsav oldallánca több alkéncsoportot tartalmaz. Ezen alkéncsoportokhoz jódot és más halogént viszünk be merőlegesen az alkén kötésre. Ez a jód helyettesíthető merkaptocetsavval (Aldrich, Milwaukee, WI, katalógusszám: M310-8) vagy 3-merkaptopropionsavval (Aldrich, katalógusszám: M580-11). A különbség a két reagensben az, hogy a spacer lánc hosszúsága más a hordozó és a haptén között. Hosszabb spacer láncokat szintén lehet alkalmazni. A terméket kromatográfiával tisztíthatjuk SEPHADEX™ A-50 tölteten (Pharmacia, Piscataway, NJ), eluensként acetonitril/víz 1:1 elegy alkalmazásával, SEPHADEX™ LH-20 tölteten (Pharmacia) eluensként metanollal, majd SEPHADEX™ G-10 tölteten (Pharmacia) eluensként vízzel. A kiindulási anyagként alkalmazott C-8.2-t normál plazmából izolálhatjuk. A C-8.2 tioglikolát-származékát kapcsolhatjuk szarvasmarha szérum albuminnal (BSA) EDC alkalmazásával (1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid-hidroklorid). Eljárhatunk úgy is, hogy egy komplett kit-et alkalmazunk a kapott terméknek tioglikoláthoz való kötésére (Pierce, Rockford, IL; katalógusszám: 77101 A).

A fenti konjugátumokat alkalmazhatjuk a C-8.2-vel szembeni specifikus antitestek kialakítására. Ezek az antitestek le-

hetnek poliklón antitestek (Lieberman, S. és munkatársai, Recent Progress in Hormone Research 15: 165-200, 1959) vagy monoklón antitestek (Blethen, S.L. és munkatársai, J. Ped. Endocrin 3: 217-223 (1989)).

### **Eljárás tracer előállítására**

Ismert egy módszer a foszfolipidek jelzésére (Anthonov P. A. Pancheva R.P., Ivanov I.G. Biochem. Biophys. Acta 835: 408-410 1985). Ennél a módszernél 1 mCi Na [<sup>125</sup>I] (Dupont, Boston, MA) anyagot elkeverünk 10 µl vízzel és 10 µl 0,3 mólos nátrium-acetáttal, pH = 4,5, és hozzáadunk 10 µl frissen készített 3 mmól TiCl<sub>3</sub>-at. A térfogatot ezután 100 µl-re beállítjuk. A keveréket 5 percig 10-15 mg C-8.2-vel reagáltatjuk (0,5 - 1,0 ml) kloroform/metanol 1:1 eleggyel készült oldat formájában. A keveréket szobahőmérsékleten 10 - 15 percig inkubáljuk, majd a reakciókeverékhez 3 ml kloroformot és 5 ml 20 mmól-os Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oldatot adagolunk. A kapott keveréket forgatás közben rázzuk, majd 250 g mellett 5 percig centrifugáljuk. Az alsó szerves fázis tartalmazza a lipideket. A lipid terméket 2 x 5 ml 20 mmól-os Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oldattal mossuk, a kloroformos extraktumot szárazra pároljuk, és vékonyrétegkromatográfiával (Whatman, Alltech, Chicago, IL) vagy SEPHADEX™ LH-20 töltetű oszlopon tisztítjuk. A végső termék specifikus aktivitása 10 µCi/mg foszfolipid.

Eljárhatunk úgy is, hogy a reakciót Chloramine T-vel (Pierce Chemicals) katalizáljuk a következők szerint. 1 mCi Na [<sup>125</sup>I] (DuPont, Boston, MA) 10 µl vízzel készült oldatát elkeverjük 10 µl 0,1 mólos foszfátpufferral, pH = 7,2, majd hozzáadunk Chloramine T-t (10 µl 20 mmól-os oldat), és a térfogatot

100 µl-re egészítjük ki. A reakciót, majd a tisztítást a fentiek szerint végezzük.

Ismert egy enzimatikus módszer is a jódnak a foszfolipidekbe való bevezetésének katalizálására (Benenson A., Mersel M., Pinson A. és Heller, M. Anal. Biochem. 101: 507-512, 1980). Ennél a módszernél a specifikus foszfolipidet ultrahanggal kezeljük Ca-Mg-mentes foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS, pH = 7,4). A foszfolipidhez 100 µl, 0,1 mCi hordozómentes [<sup>125</sup>I]-t (DuPont, Boston, MA) adunk, majd hozzáadunk 50 µl laktoperoxidázt (0,25-2,5 µg, BioRad, Richmond CA), 50 µl 300 µU glükóz-oxidázt (BioRad) és 250 mól glükózt 50 µl-ben. A keveréket szobahőmérsékleten 15 percen át inkubáljuk, majd hozzáadunk 10 µl 6,6 mmól-os tioszulfátot (Fisher Chemicals, Springfield, NJ), és a kapott terméket a fentiek szerint tisztítjuk.

### **Eljárás az antitest és tracer felhasználására**

Egy tipikus antitest-alapú vizsgálatot a következőképpen végzünk.

#### **1. Az antitest kezdeti kimutatása és titrálása**

C-8.2-BSA konjugátumokkal (vagy médiumot vagy fluidumot tartalmazó monoklon antitesttel) immunizált nyulakból származó szérumot széria hígításnak vetettünk alá szarvasmarha szérum albuminnal (BSA) foszfáttal pufferolt sóoldatban, pH = 7,4. A fentiek szerint előállított tracert ugyanazon pufferral 40 000 - 125 000 CPM/ml koncentrációra hígítunk. A széria hígításokat egy 12 x 75 mm-es üvegcsőbe pipettázzuk, és 0,4 ml tracer jelenlétében 1 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az inkubáció után a csöveket hűtőszekrénybe tesszük (2-4 °C) 20 percre.

Ezután hozzáadunk nyúl IgG specifikus immuno-gyöngyöket (Bio-Rad, Richmond, CA). (Ha monoklón antitesteket alkalmazunk, az immuno-gyöngyök egér IgG-re kell hogy specifikusak legyenek). Mindegyik csövet ezután forgatás közben rázzuk, majd 1 órán át hűtőszekrényben 2 - 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A második inkubációt követően a csöveket hűtött centrifugában 2000 g mellett 20 percen át centrifugáljuk, majd a felülúszót eldobjuk anélkül, hogy a pelletet megzavarnánk. A csöveket ezután gamma számlálóval számláljuk (LKB, Gaithersburg, MD). A vizsgálathoz felhasználásra kerülő anti-test-kezdő hígítás az, amely a maximális értéknek megfelelő kötés 50 %-át eredményezi. A legtöbb szérum esetén, amelyet a megfelelő immunizálás után vettünk, a felhasználásra kerülő aktív hígítás értéke 1/1000 és 1/50 000 közötti értékű, 10 000 - 500 000/ml szérum végső hígításhoz. A standard görbe meghatározása után az antitestek végső hígítását tovább módosítottuk a szenzitivitás szabályozására az alábbiakban ismertetett módon.

## 2. Standard görbék felvétele

Tiszta C-8.2-t (3. példa szerint elválasztva) foszfáttal pufferolt sóoldatot tartalmazó BSA-val hígítottunk, és ezt alkalmaztuk a standard görbék felvételéhez. A tényleges mennyiségeket, amelyeket a standardok felvételéhez alkalmaztunk, HPLC módszerrel határoztuk meg (1. példa). A standard görbékhez az intervallumokat az 1. példa szerinti módszerrel nyert normál értékek alapján határoztuk meg. A standard 4 tartalmazta a C-8.2 átlagértékét, amelyet a kontroll populációnál mutattunk ki. A standard 2 és 6 esetén 3 standard eltérés volt a kontroll po-

pulációnál meghatározott átlagtól lefelé vagy fölfelé. A fennmaradó standardoknál a koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy a geometriai arányokat megtartsuk. A végső antitest hígtást úgy állítottuk be, hogy a standard 4 a maximális kötés ( $B_0$ ) 50 %-át mozdítsa el, ahogy azt az 5,6 csövek esetében meghatároztuk. A tracer specifikus aktivitását jelzetlen anyag adagolásával állítottuk be (csökkentettük), hogy beállítsuk a standard görbe meredekségét, és kielégítsük ezeket a paramétereket.

### 3. Vizsgálati protokoll

Cső száma	Leírás	Magyarázat
1, 2	Nem-specifikus kötés	Antitest nélkül
3, 4	Összesen	Csak tracer, fenntartva a számláláshoz
5, 6	Maximális kötés ( $B_0$ )	Antitest és tracer (A + T)
7, 8	Standard 1 (10 $\mu$ l)	
9, 10	Standard 2 (10 $\mu$ l)	
11, 12	Standard 3 (10 $\mu$ l)	
13, 14	Standard 4 (10 $\mu$ l)	
15, 16	Standard 5 (10 $\mu$ l)	
17, 18	Standard 6 (10 $\mu$ l)	
19, 20	Standard 7 (10 $\mu$ l)	
21, 22	QC - 1 (10 $\mu$ l)	Az értéket mint az alsó végpont értéket jelöljük
23, 24	QC - 2 (10 $\mu$ l)	Az értéket mint a várt átlagot jelöljük
25, 26	QC - 3 (10 $\mu$ l)	Az értéket mint a magas végpont értéket jelöljük

27, 28	Ismeretlen (10 $\mu$ l)	A vizsgálandó egyedekből származik
stb.		További csövek, ha szükségesek

i. Megjelöljük a csöveket a fentieknek megfelelően.

ii. 10  $\mu$ l-t pipettázunk mindegyik standardból, kontrollból és ismeretlen anyagból a megfelelő csőpárba.

iii. 400  $\mu$ l tracer-t adagolunk mindegyik csőbe ismételt pipettázással. A 3 és 4 számú csöveket félretesszük, ezek készek a számlálásra.

iv. Az 1. és 2. számú csövekhez 100  $\mu$ l foszfáttal pufferolt és BSA-t tartalmazó sóoldatot adagolunk, pH = 7,4.

v. Az 5. számú csőtől kezdődően 100  $\mu$ l fentiek szerint hígított antitestet adagolunk.

vi. Mindegyik csövet forgatás közben rázzuk, 1 órán át 37 °C-on inkubáljuk.

vii. Mindegyik csövet hűtőszekrénybe tesszük (2 - 4 °C) és 30 percig inkubáljuk.

viii. 20 mg immunogyöngyöt feloldunk 20 ml foszfáttal pufferolt sóoldatban, és lassan keverjük, amíg szükséges, 2 - 4 °C hőmérsékleten.

ix. Mindegyik csőbe 100  $\mu$ l immunogyöngyöt adagolunk, majd rázzuk, és hűtőszekrényben 30 percen át inkubáljuk.

x. A csöveket 2000 x g mellett (3200 fordulat/perc) 20 percig centrifugáljuk 2 - 4 °C hőmérsékleten (RT6000 B Dupont centrifuga, Dover, DE).

xi. A folyadékot dekantáljuk anélkül, hogy a pelletet megzavarnánk, és a csöveket gamma számlálóval számláljuk.

#### 4. Minta készítés

Mindegyik vérmintát a patogént tartalmazó vér OSHA standardnak megfelelően kell kezelni. A minták előállításához a teljes vért egy zárt centrifugában 5 percen át 750 g mellett centrifugáljuk. A tiszta szérumot egy alkalmas jelzett üvegcsőben visszük át, lezárjuk, és -70 °C hőmérsékleten tároljuk a vizsgálatig. A vizsgálatkor a mintát szobahőmérsékleten felolvasztjuk és óvatosan forgatás közben rázzuk. A felolvasztáshoz nem lehet hőt alkalmazni. Nem szabad, hogy a minták hosszú időn át fagyasztás nélkül maradjanak.

#### 5. Az eredmények analízise

i. A standardokat úgy alkalmaztuk a görbék kialakításához, mint a többi RIA módszernél [(a) görbe kötött anyag beütésszáma vs. koncentráció, (b) kötött anyag beütésszáma vs. log koncentráció, vagy (c) log kötött anyag beütésszáma vs. log koncentráció]. A standard görbékkel interpolálás nem történt. A számításokat végezhetjük kézzel vagy komputer segítségével.

ii. Az eredményeket akkor fogadjuk el értékelhetőnek, és az eredményeket akkor adjuk meg, ha a QC minták a várt intervallumokon belül vannak.

iii. A HIV fertőzés diagnosztizálását más módszerrel is igazoltuk, így például PCR vagy Western blot analízissel. Abban az esetben, ha a diagnózist valamely említett módszerrel nem lehetett igazolni, további mintákat állítottunk elő és vizsgáltuk.

Az RIA analízis mellett a C-8.2 koncentrációjának meghatározását a szérumban más, specifikus antitesteken alapuló vizsgálattal is elvégezhetjük (például IRMA, EIA vagy ELISA), vagy alkalmazhatunk más standard szín-kifejlesztési módszert is,

részletekben tisztítottuk, és a megfelelő frakciókat egyesítettük. A frakciók C-8.2 koncentrációját HPLC-vel határoztuk meg. Egy reprezentatív kromatogramot mutatunk be a 4. ábrán. A C-8.2 anyagot tartalmazó frakciókat egyesítettük, és szárazra pároltuk egy kitarázott V-fiolában (Fisher, Springfield, NJ) száraz nitrogén áramban. A V-fiolákat megmértük, a részlegesen tisztított C-8.2-t minimális mennyiségű metanolban feloldottuk és a termék mennyiségét HPLC-vel meghatároztuk. A legnagyobb C-8.2 csúcsot mutató frakciók mutatták a legkisebb csúcsokat más anyagokra vonatkozóan. Mivel a mérési hullámhossz 210 nm, és a szennyeződések túlnyomórészt más hullámhosszúságú fényt abszorbeálnak, a tisztítás tényleges mértékét nem tudtuk meghatározni.

A legnagyobb specifikus aktivitást mutató frakciók a 9 - 14. számú frakciók, de bizonyos mennyiségű C-8.2 jelen van a 12-14. frakciókban is. Ezek a mellékfrakciók alacsonyabb specifikus aktivitást mutatnak. A további tisztításokhoz csak a nagy specifikus aktivitású frakciókat (9-11) alkalmaztuk.

A C-8.2 tisztításának utolsó lépése egy preparatív HPLC, amelyet NH<sub>2</sub>-Lichrosorb töltetű oszlopon végeztünk (10 x 250 mm, Alltech). Az oszlopra az anyagot 95 % acetonitril/5 % víz elegyben vittük fel. A C-8.2-t lineáris gradienssel eluáltuk, 40 % acetonitril - 60 % víz. A kapott kromatogram, amelyhez ugyanazon gradienst alkalmaztuk, mint a szérum mintánál, egyetlen csúcsot mutat 8,2 percnél, jelezve, hogy az anyag ezen körülményeknél homogén (adat nem látható).

A nem fertőzött felnőttektől származó 1,5 liter mennyiségű plazmából izolált C-8.2 specifikus aktivitása (AU/mg) alapján a közelítő C-8.2 koncentráció 100 mg/l vagy kb. 125  $\mu$ mól.

### **UV analízis**

A C-8.2 UV spektrumát lambda 3a UV/VIS típusú spektrofotométerrel (Perkin-Elmer, South Plainfield, NJ) határoztuk meg. A mintát a következőképpen készítettük: Az anyagot 80 % acetonitril - 20 % víz elegyben készítettük. Ugyanezt az oldatot alkalmaztuk referenciaként. Az oldószerkeverék 200 nm-nél hosszabb hullámhosszúságú fényt nem abszorbeál.

A C-8.2 UV abszorpciós spektrumát a 6. ábrán mutatjuk be. A spektrum szignifikáns része a 210 nm-nél és ennél rövidebb hullámhosszaknál mutatott maximális abszorpció és az, hogy nincs csúcs 220 - 280 nm között. Ezen hullámhosszaknál hiányzó csúcs igazolja az aromás csoportok, így aminosavak, nukleinsavak vagy pteridinek hiányát.

### **FTIR analízis**

A C-8.2 Fourier transzformációs infravörös (FTIR) analízis spektrumát a 7a. és 7b. ábrán mutatjuk be. A spektrumokat kereskedelmi forgalomban beszerezhető laboratóriumi berendezésen vettük fel (Hauser Chemicals, Golden Colorado).

A mintákat metanolban oldottuk és bevittük az FTIR spektrométerbe KBr pellet formájában. Egy második spektrumot is felvettünk a mikroszkóp kapcsolat felhasználásával. A lehetséges azonosítás érdekében kapott spektrumokat összehasonlítottuk a referencia spektrumokkal, amelyek ismert gyűjteményekből származnak.

A 7a. ábrán bemutatjuk a KBr pellet formájában előállított minta spektrumát. A 7b. ábrán látható az FTIR spektrum, amelyet ugyanezen mintáról vettünk fel mikroszkóp alkalmazásával. A 8a. és 8b. ábrák lényegében azonosak. A 8. ábrán látható egy sorozat ismert anyagra vonatkozó spektrum, amely az öt legjobban illeszkedő spektrumot mutatja, a hozzáférhető spektrum adatbázisokból.

Az FTIR spektrumok alapján igen nagy a valószínűsége egy észterből származó karbonil jelenlétének. A karbonil feltételezhetően nem konjugált. Továbbá, erős abszorpció mutatható ki  $1249\text{ cm}^{-1}$  értéknél, ez pozitív jelzés a P-O funkciós csoport jelenlétére. A  $3278\text{ cm}^{-1}$  értéknél mutatott széles abszorpció utalhat hidroxil funkciós csoportra.

### **FAB-MS analízis**

A C-8.2 tömegspektrogramját a 9. és 11. ábrákon mutatjuk be.

A 9. ábrán látható a fentiekben említett 24 frakció FAB-MS spektruma. A 9. ábrán az 572-nél mutatkozó csúcs Gramicidinből származik, amelyet külső kontrollként alkalmaztunk. A 10. ábrán látható a szfingozil-foszforil-kolin (SPC) számára egy autentikus standard FAB-MS spektruma. A 10. ábrán lévő ablak egy kinagyítása a kontroll csúcsok területének. A 9. és 10. ábrát összehasonlítva láthatjuk, hogy a 24 frakció SPC-t tartalmaz (csúcsa van  $466,7$  értéknél).

A 11. ábrán látható a felnőtt humán szérumból származó 25 frakció FAB-MS spektruma. A 11. ábrán az 523 és 572 értékeknél levő csúcsok a belső standardokból származnak, amelyeket az analízis előtt a 25 frakcióhoz adagoltunk. A 25 frakció spekt-

ruma ugyancsak tartalmaz egy csúcsot 466-nál, jelezve, hogy a C-8.2 egyik komponense SPC.

A 12. ábrán látható a foszfatidil-kolin (lecitin) spektruma. Az, hogy a 11. ábrán (25 frakció) a 760 értéknél nincs csúcs, és nincs csúcs a 497 értéknél (ezt a 11. ábrán megfigyeltük) igazolja, hogy a lecitin nem komponense a C-8.2-nek.

A fenti FAB-MS analízisből kitűnik, hogy az SPC komponense a C-8.2-nek.

### **További tisztítási eljárás**

Annak érdekében, hogy elegendő anyag álljon rendelkezésre a C-8.2 szerkezetének azonosítására, a tisztítási módszert 10 liter szérumra terjesztettük ki.

A kezdeti extrakciós eljárás (4 térfogatnyi acetonitrillel való elkeverés) kétszerese volt az előbbieket szerinti eljárásnak. Az extraktumot ezután benzol adagolásával megosztottuk, a felső szerves fázist szárazra pároltuk és SEPHADEX™ LH-20 oszlopon (Pharmacia, Piscataway, NJ) kromatografáltuk, oldószerként metanolt alkalmazva. Az anyagot tartalmazó frakciókat, amelyeket a 8,2 percnél eluáltunk (8-12 számú frakciók) egyesítettük és vákuumban betöményítettük. Az egyesített frakciókat preparatív HPLC kromatográfiának vetettük alá (2 ml összesen 0,35 ml-es részletekben). Mindegyik frakció alikvot részét vizsgáltuk analitikai HPLC oszlopon a fentiek szerint. Anyagot a következő frakciókban találtunk: (a) 24, (b) 25, (c) alacsonyabb koncentrációban a 26-31 frakciókban, ezt P2-nek jelöltük, és (d) az 50-60 frakciókban, ezt P1-ként jelöltük. A frakciók keverése nem mutatta semmilyen dublett jelenlétét az analitikai oszlopon.

A 25 frakcióból egy alikvot részt (az össz-mennyiség 5 %-át) FTIR-rel analizáltuk. A kapott görbe megfelelt egy foszfolipidnek, a szfingofoszforsil-kolinnak, de a lipid és annak zsírsav-észterének teljes szerkezetét nem tudtuk azonosítani.

#### **4. példa**

##### **Helyettesítő marker azonosítása HIV fertőzéshez**

A fenti HPLC módszerrel nagy mennyiségű (100 mg) C-8.2-t tisztítottunk látszólagos homogenitásig szarvasmarha vérből (5 liter). A termék molekulatömege a meghatározás szerint 758 és 786 dalton keveréke. Ezt létrehozhatjuk a szfingozil-foszfokolin és a megfelelő két további szénatomot tartalmazó vegyület linolénsavval alkotott acil-amidjának kialakításával. Ezen szerkezetek triviális neve a szfingomyelin. A szfingomyelin nem korlátozódik a linolénsav-szfingozil-foszfokolinra, hanem más szfingozil-foszfokolin-zsírsav-amidokra is vonatkozik. Valódi (autentikus) palmitoil-szfingozil-foszfokolin szerezhető be a Sigma Chemical Co. cégtől (St. Louis, MO), és ezt alkalmaztuk modell vegyületként. Ez az eredeti anyag ugyanazt a HPLC retenciós időt mutatja, mint az izolált anyag (adat nem látható). Az FTIR ugyancsak megegyezik (adat nem látható). Ha a modell vegyületet és az izolált anyagot (azaz C-8.2-t) proton NMR analízissel vizsgáljuk, azok igen hasonló spektrumot mutatnak (adat nem látható).

A szfingomyelin egy fő foszfolipid komponense a sejtmembránoknak. A szerkezeti elemek a következők: N-acil-szfingozil-foszfokolin, ahol az acilcsoport általában vagy egy 16 vagy 24 szénatomos zsírsav. A magas szérumszint ellenére (több mint 400  $\mu\text{mol/liter}$  vagy 35 mg/dl) az enzimek és a szabályozó me-

chanizmusok mind a szintézisüket, mind a degradációjukat illetően igen kis mértékben vannak jellemezve. A szfingomyelin szükséges a makrofág/monocita sejtek differenciálódásához a forbol-észterekre válaszképpen. Ez az eljárás protein kináz C függő, és szfingozinnal gátolt. Így a szfingomyelin és annak prekursorai fontos szerepet játszanak a monociták differenciálódásában, és hasonló szerepe lehet a limfocitáknál is, beleértve a CD4+ sejteket.

A szfingomyelin ceramidokká bomlik el szfingomyelináz hatására, amely egy extracelluláris plazmamembrán enzim, és nagy koncentrációban van jelen az agyban, a májban és a mellékvesékben. A Niemann-Pick szindrómát a szfingomyelin ceramidokká való bomlását katalizáló öt enzim valamelyikében bekövetkező belső hiba okozza, ez vezet a szérumban a szfingomyelin magas szintjéhez. Azoknál az egyedeknél, akik ilyen szindrómában szenvednek, megnövekedett a rizikó az autoimmun betegségek kifejlődésére, amelyet a megnövekedett limfocita proliferáció okozhat, ez pedig a megnövekedett szfingomyelin szint következménye.

A szérum megnövekedett szintek szoros metabolikus szabályozás alatt vannak, ezt mutatja (a) a megfigyelt szűk koncentráció tartomány ( $35 \pm 3,5$  mg/dl), (b) a napról napra történő változás hiánya és (c) az étkezés utáni koncentráció változás hiánya. Azonban e szabályozás biokémiai alapja még nem ismert.

Mint leírjuk, a szfingomyelin szintek megfigyelt természetes menete a HIV fertőzést követően a következő: (a) egy azonnali tranziens csökkenés; (b) hosszantartó növekedés, ha a HIV-specifikus antitestek kifejlődnek és (c) a normál értékre való

visszatérés, ha az AZT terápia hatásos. Az említett növekedés a fiziológiai kontroll visszaállításának következménye HIV hiányában, válaszképpen az antitest termelésre. A szérumszfingomyelin szintek ezután növekednek addig, amíg a szupranormál szinteket elérik. Az AZT terápiára válaszképpen a szfingomyelin szintek visszatérnek a normál szintre bármelyik extrém értékről. Ezek a változások utalnak a HIV-re, mint ami módosítja a specifikus szabályozási utat a szérumszfingomyelin szinteknél. Ha ez a helyzet, megjósolható, hogy ezen változásokra válaszképpen változás következhet be a limfocita differenciálódásban és az előre jelzés igazolódik.

Anélkül, hogy bármilyen elmélethez kötődnénk, úgy gondoljuk, hogy az anyagok, amelyek specifikusan beleavatkoznak a szfingomyelin szintézisének vagy degradációjának szabályozásába, megakadályozhatják az immunrendszer sejtműködésének retrovírusok okozta megváltozását. A szérumszfingomyelin szintben bekövetkező kezdeti változást okozhatja (a) egy megnövekedett degradáció, vagy (b) csökkent szintézis. A terápia kezdő célpontja a tényleges mechanizmus alapján lenne meghatározva.

A fertőzés alatt a HIV első biokémiai hatásainak egyike a CD4+ limfociták csökkent differenciálódása, míg később a fertőzés folyamán a CD8+ limfociták differenciálódása növekszik. Mindkét hatás esetén lehet változás a szfingomyelin koncentrációban, amit először ismertettünk ebben a bejelentésben. Így a szfingomyelin szinteket szabályozó enzimek egy új célt jelentenek a HIV-fertőzött egyének kezelésénél. Az anyagok, amelyek valamely ilyen enzimhez kötődnek, és gátolják a HIV hatását

ezen enzimen, különösen fontosak lehetnek, mivel ezek megakadályozhatják a sejtről sejtre való átvitelt, és így lehetővé teszi a nem antitesten alapuló immun funkcióknak a fertőzött sejtek eltávolítását. Az ilyen típusú eljárás inkább a fertőzés tényleges eliminálásához és nem annak elfojtásához vezethet.

### Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás HIV-fertőzött egyének azonosítására, azzal jellemezve, hogy

- az egyéntől származó vérben vagy vér frakcióban meghatározzuk valamely következő anyag mennyiségét: szfingomyelin, szfingozil-foszfokolin vagy ceramidok, és

- az egyént HIV-fertőzöttnek minősítjük, ha a beteg vérből vagy vér frakciójából származó mintában az említett anyag mennyisége statisztikusan különbözik egy a kontroll csoportból, azaz nem HIV-fertőzött csoportból származó vér vagy vér frakció mintában meghatározott mennyiségétől.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a statisztikus különbség három standard eltérés.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az anyag mennyiségi meghatározását HPLC kromatográfiával végezzük.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett anyag (C-8.2) mennyiségi meghatározását antitesteken alapú vizsgálattal végezzük.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy antitesteken alapuló vizsgálatként IRMA, EIA, RIA vagy ELISA vizsgálatot végzünk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vér frakció mintaként szérumot alkalmazunk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mennyiségi meghatározást a betegen a HIV-vel való fertőzést követő 1 héten belül végezzük.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mennyiségi meghatározást a fertőzést követően 2 napon belül végezzük.

9. Eljárás HIV-fertőzött betegek azonosítására, azzal jellemezve, hogy

a) a betegtől vért vagy vér frakció mintát veszünk,

b) a mintában meghatározzuk valamely következő anyag mennyiségét: szfingomyelin, szfingozil-foszfokolin vagy ceramidok, és

c) az említett anyagok meghatározott mennyiségét összehasonlítjuk egy hasonló korú, nem HIV-fertőzött egyedekből származó kontroll csoportból vett vér vagy vér frakció mintában meghatározott mennyiségekkel,

és a beteget HIV-fertőzöttnek minősítjük, ha a betegtől vett mintában az említett anyagok mennyisége statisztikusan különbözik a kontroll csoporttól vett mintában meghatározott mennyiségtől.

10. Eljárás HIV-fertőzött humán betegeknél alkalmazott kezelés hatásosságának meghatározására, azzal jellemezve, hogy

a) meghatározzuk a kezelés előtt a betegektől vett vér vagy vér frakció mintában a valamely következő anyag mennyiségét: szfingomyelin, szfingozil-foszfokolin vagy ceramidok, és

b) i. meghatározzuk az említett anyagok mennyiségét a betegtől a kezelés alatt vett vér vagy vér frakció mintában, vagy

ii. meghatározzuk az említett anyagok mennyiségét a betegtől a kezelést követően vett vér vagy vér frakció mintában,

és a kezelést hatásosnak minősítjük, ha az említett anyagok mennyisége az a) pont szerinti mintában statisztikusan különbözik a b) pont szerinti mintában meghatározott mennyiségtől.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a statisztikus különbség három standard eltérés.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a), b) vagy a) és b) pontok szerinti meghatározást HPLC kromatográfiával végezzük.

13. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a), b) vagy a) és b) pontok szerinti mennyiségi meghatározást antitesten alapuló vizsgálattal végezzük.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy antitesten alapuló vizsgálatként IRMA, EIA, RIA vagy ELISA vizsgálatot alkalmazunk.

15. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a), b) vagy a) és b) pontok szerinti vérfrakció minta szérum.

16. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett kezelést AZT, ddl, ddC vagy ezek keverékének adagolásával végezzük.

17. Eljárás HIV-fertőzött humán betegeknél alkalmazott kezelés hatásosságának meghatározására, azzal jellemezve, hogy

a) a betegtől vér vagy vérfrakció mintát veszünk a kezelés előtt,

b) meghatározzuk az a) pont szerinti mintában valamely következő anyag mennyiségét: szfingomyelin, szfingozil-foszfokolin vagy ceramidok,

c) i. a betegtől vért vagy vérfrakció mintát veszünk a kezelés alatt, vagy

ii. a betegtől vér vagy vérfrakció mintát veszünk a kezelést követően, és

d) meghatározzuk az említett anyag mennyiségét a c) pont szerinti mintában,

e) összehasonlítjuk az a) pont szerinti mintában meghatározott mennyiséget a c) pont szerinti mintában meghatározott mennyiséggel,

és a kezelést hatásosnak minősítjük, ha az a) pont szerinti mintában meghatározott mennyiség statisztikusan különbözik a c) pont szerinti mintában meghatározott mennyiségtől.

18. Valamely következő anyag alkalmazása HIV-fertőzött egyedek azonosítására és a terápia követésére: szfingomyelin, szfingozil-foszfokolin és ceramidok.

19. Eljárás HIV-fertőzött betegek azonosítására, azzal jellemezve, hogy

- a betegtől szérum mintát veszünk,

- meghatározzuk a szérum mintában valamely következő anyag mennyiségét: szfingomyelin, szfingozil-foszfokolin vagy ceramidok,

- összehasonlítjuk az említett szérum mintában meghatározott mennyiséget egy hasonló korú, nem HIV-fertőzött kontroll csoporttól vett szérum mintában meghatározott mennyiséggel,

- és az említett beteget HIV-fertőzöttnek minősítjük, ha az említett anyag mennyisége a beteg szérum mintájában statisztikusan különbözik a nem HIV-fertőzött kontroll csoporttól vett mintában meghatározott mennyiségtől.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a statisztikus különbség három standard eltérés.


21. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mennyiségi meghatározást HPLC kromatográfiával végezzük.

22. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mennyiségi meghatározást antitesten alapuló vizsgálattal végzzük.

23. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy antitesten alapuló vizsgálatként IRMA, EIA, RIA vagy ELISA vizsgálatot alkalmazunk.

A meghatalmazott:

**Danubia Szabadalmi és  
Védjegy Iroda Kft.**

  
Olchváry Gézáné  
szabadalmi ügyvivő

*Handwritten notes:*  
2007.11.14  
Különbség  
HPLC  
Balázs  
C. Balázs  
OK 27. 11. 11.

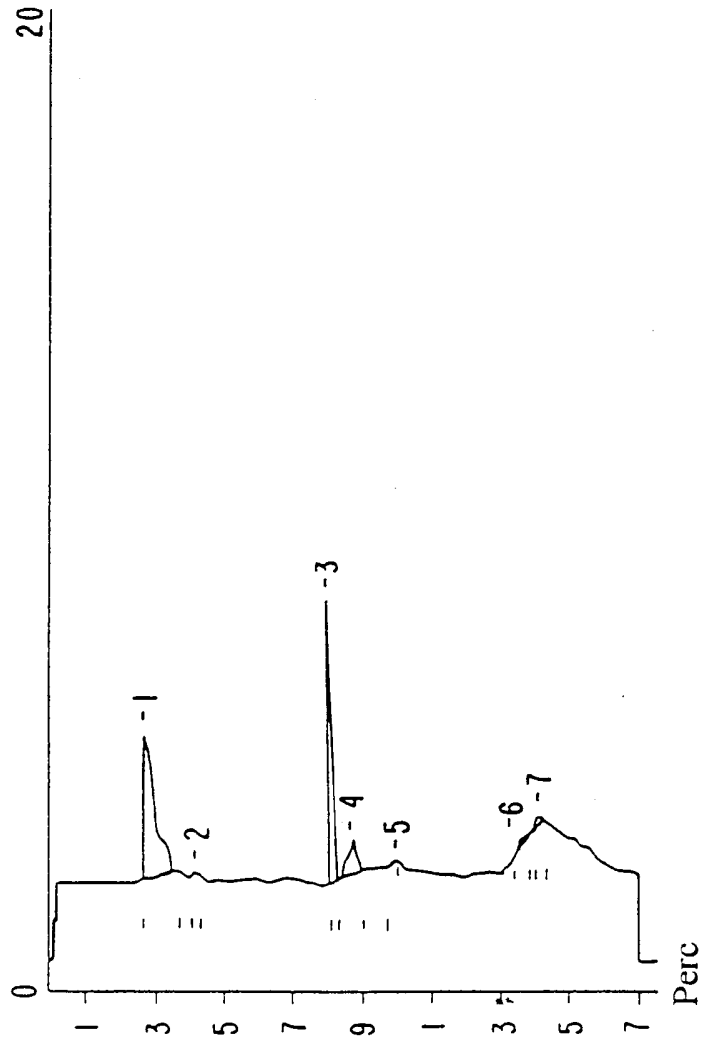
950097

2003 / 96

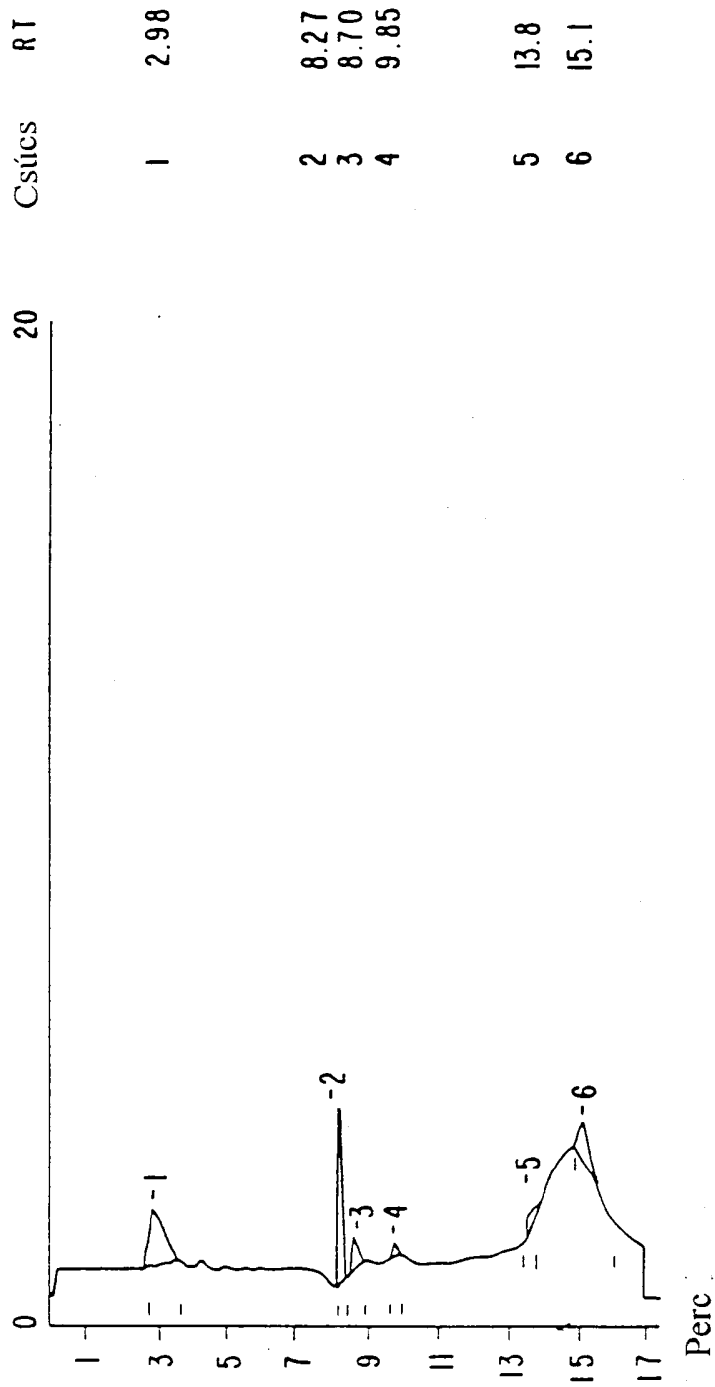
# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

1/13

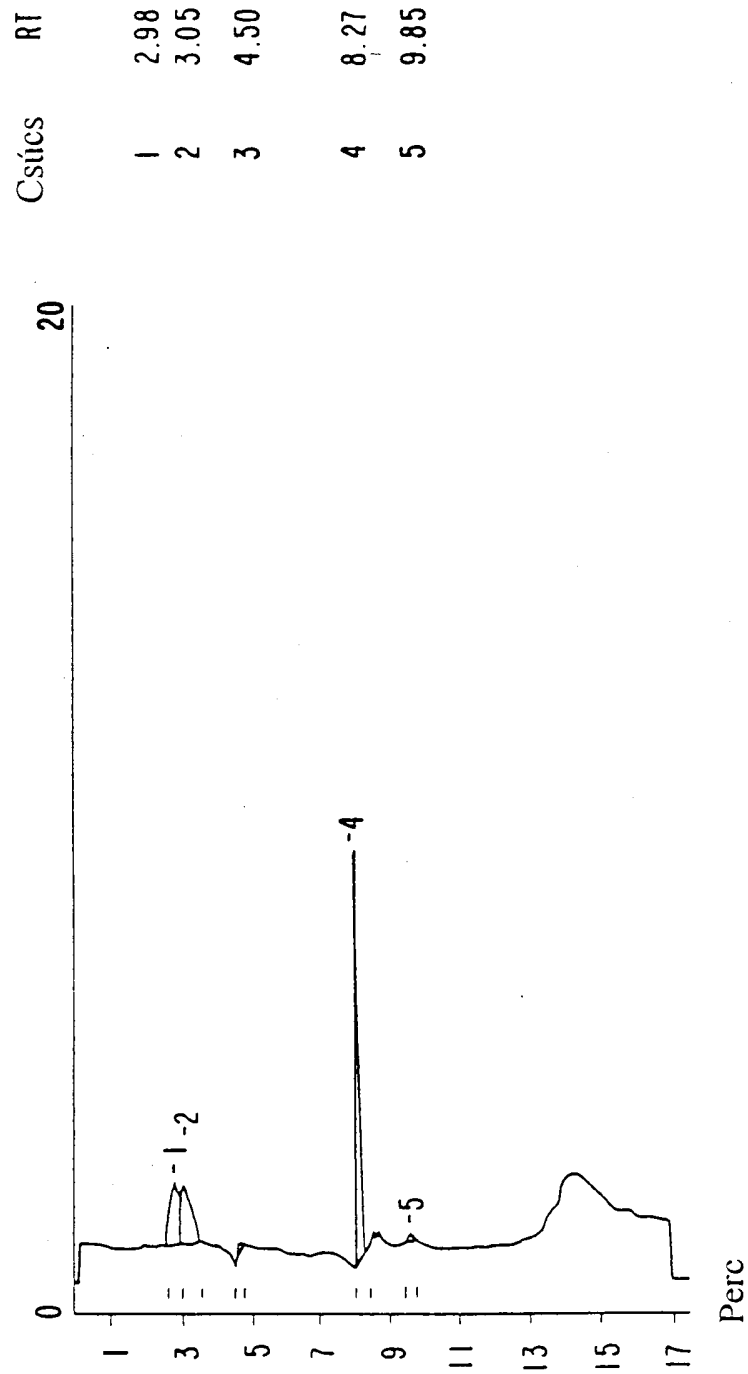
Csúcs	RT
1	3.00
2	4.27
3	8.27
4	8.87
5	9.93
6	13.78
7	14.27



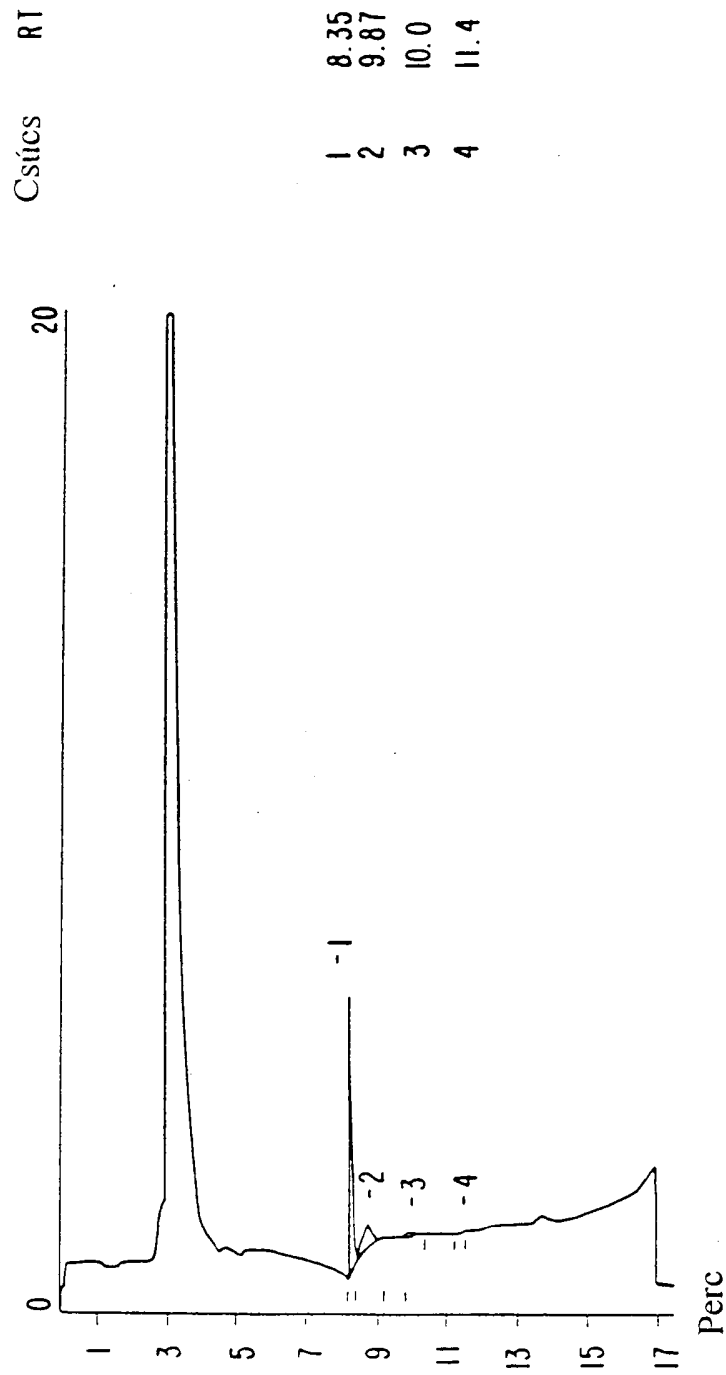
1. ÁBRA



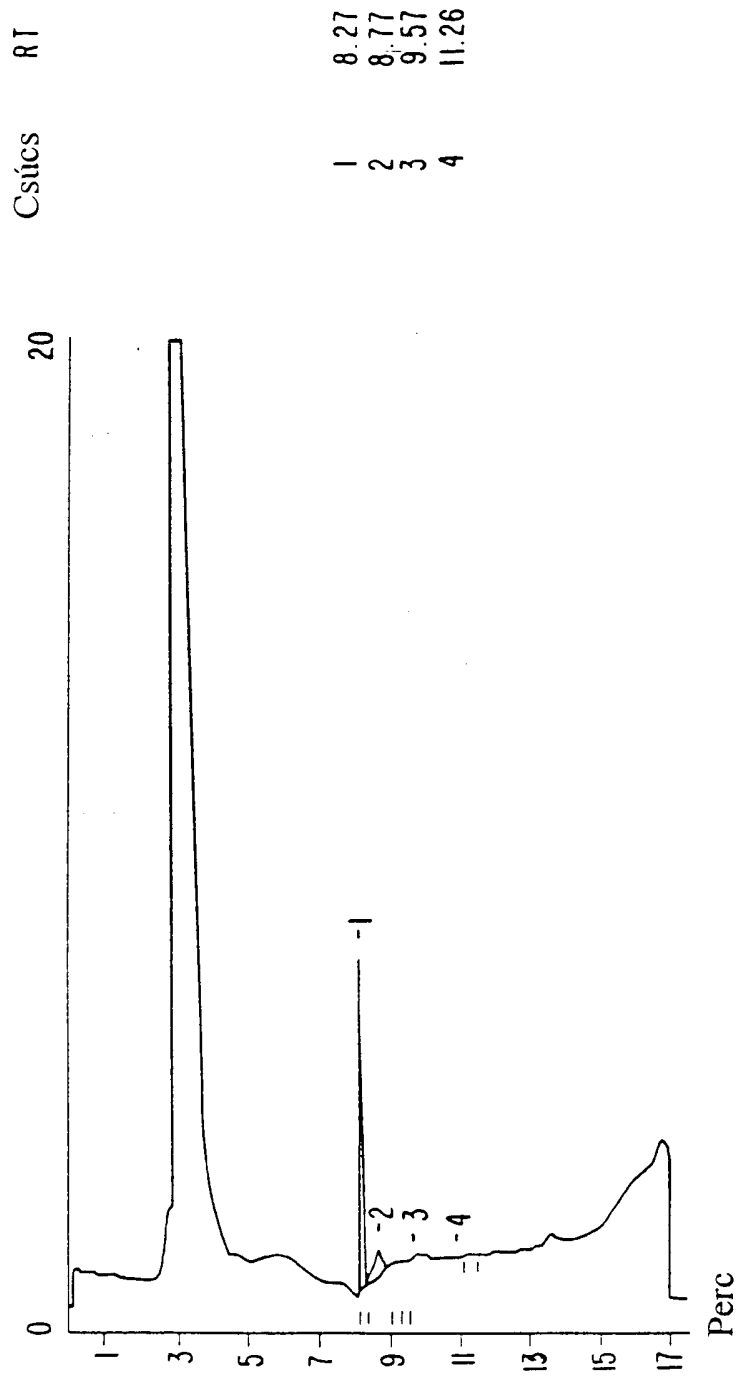
2. ÁBRA



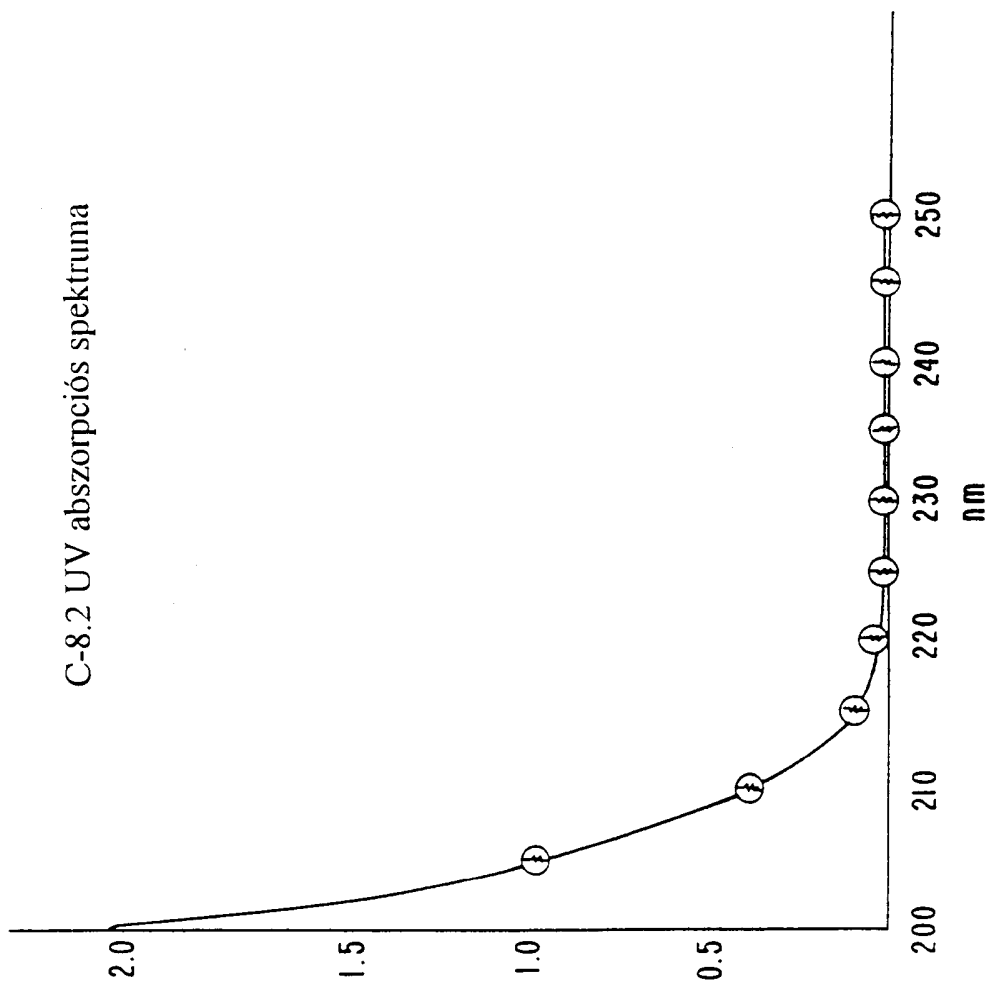
3. ÁBRA



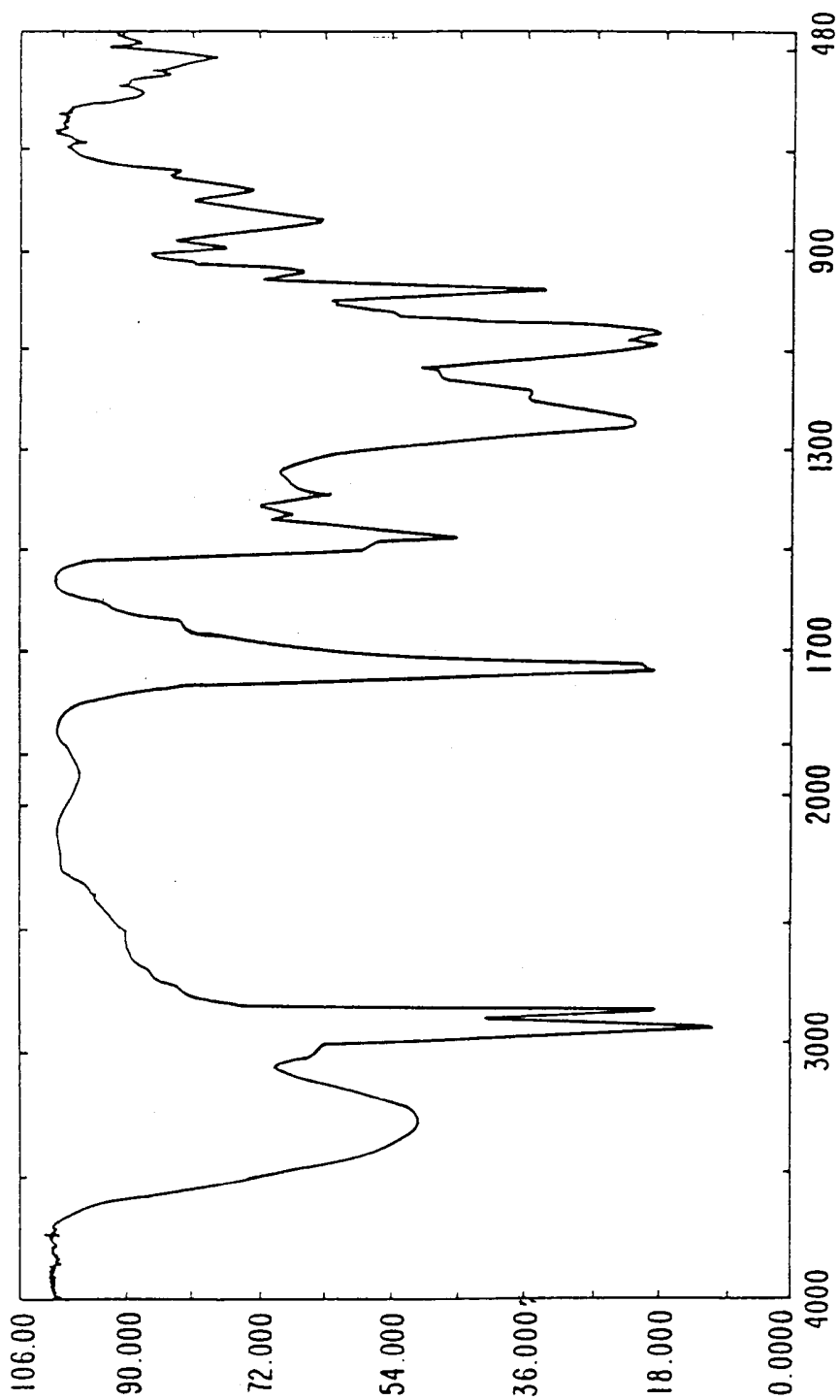
4. ÁBRA



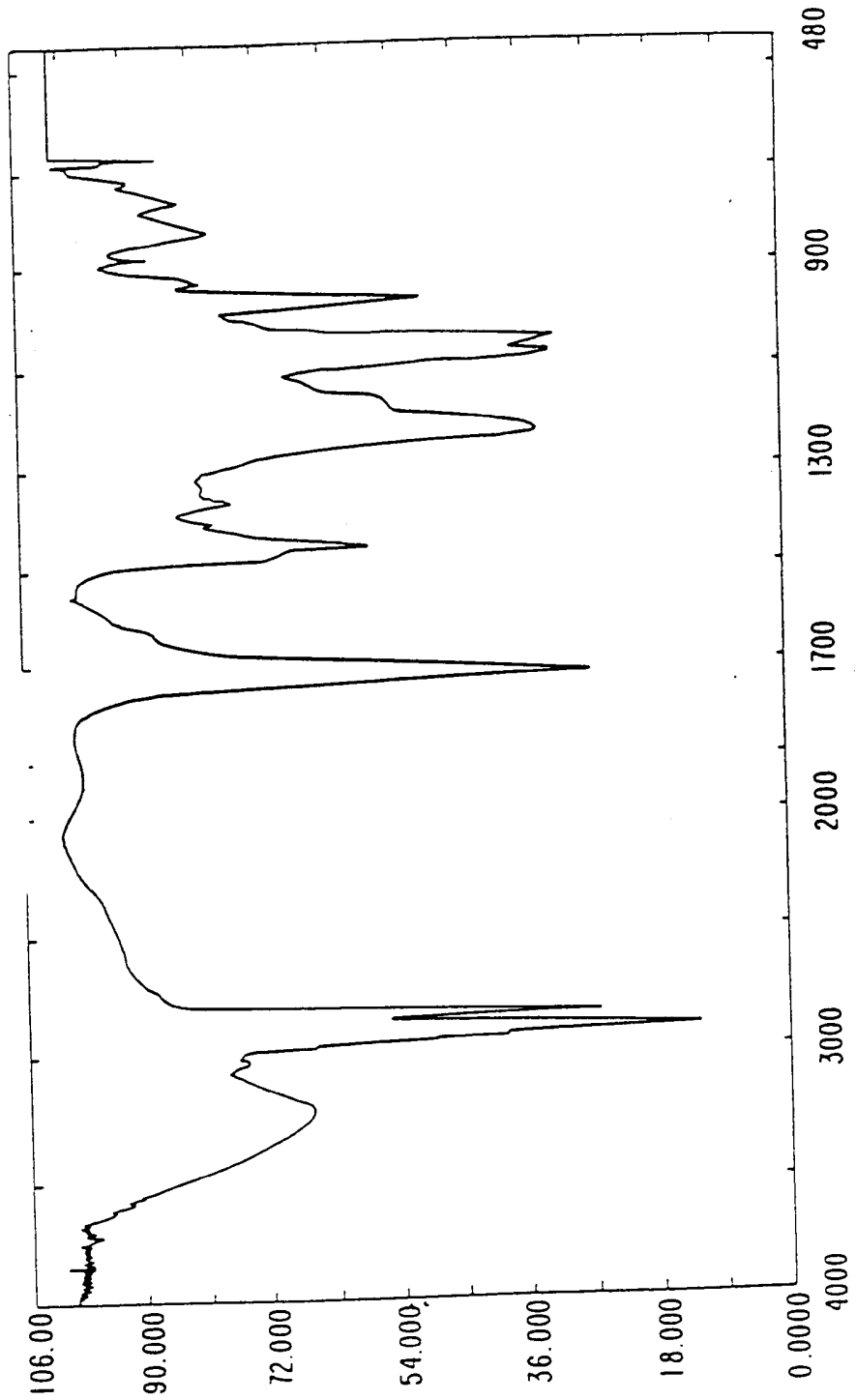
5. ÁBRA



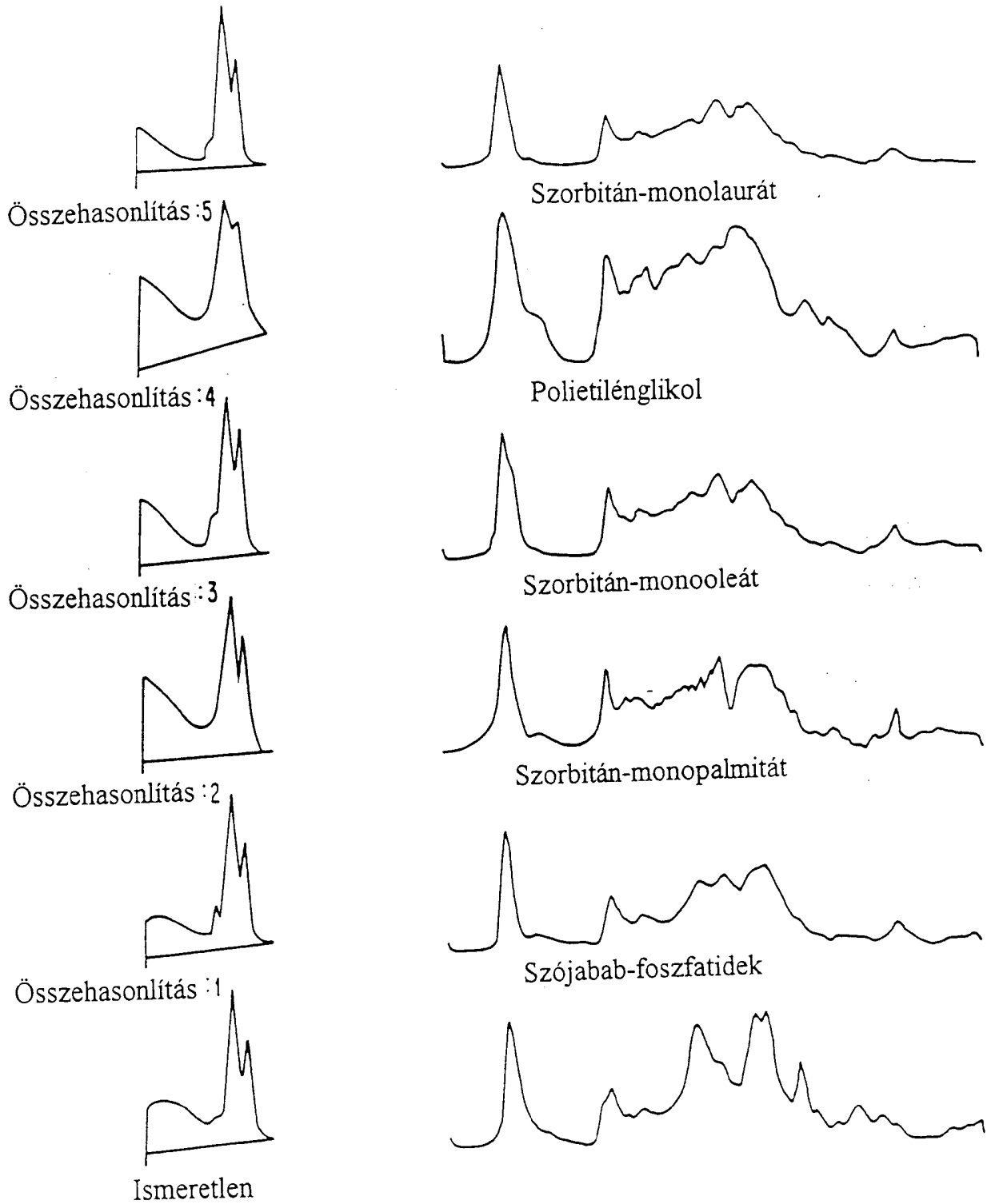
6. ÁBRA



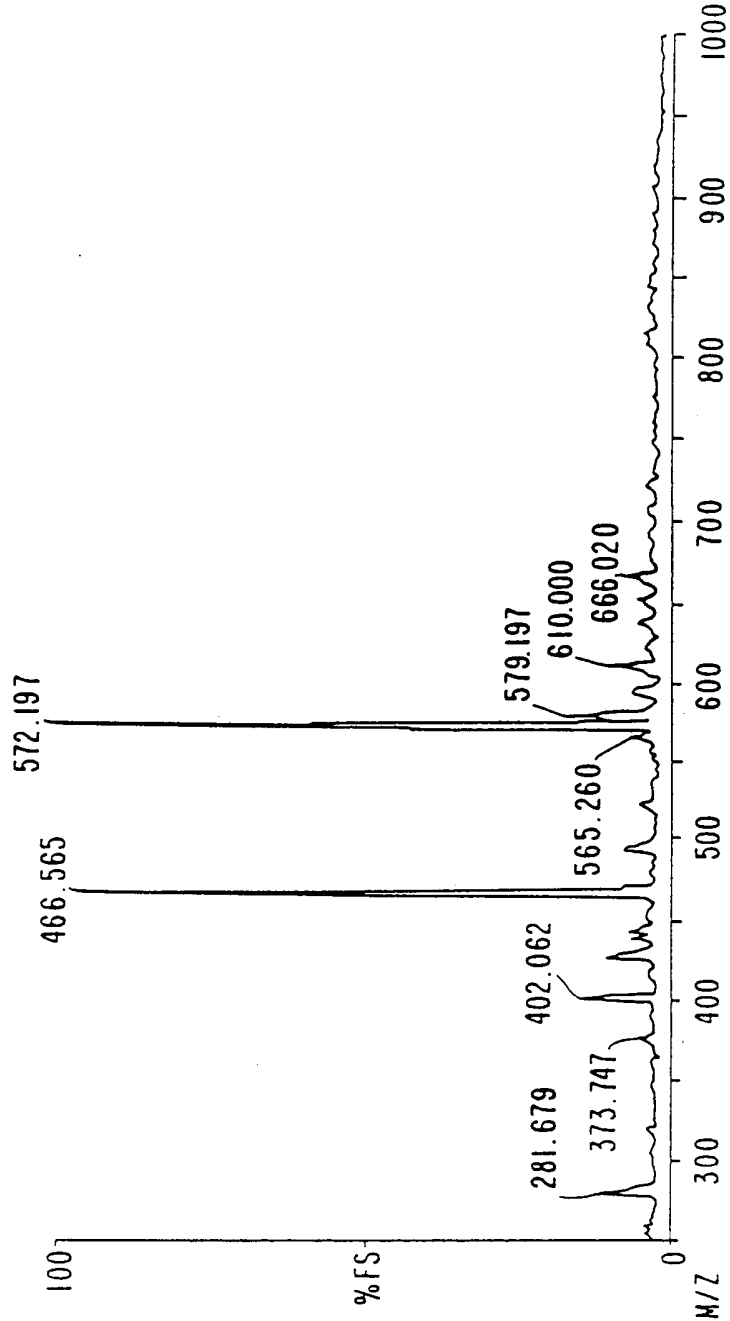
7. ÁBRA



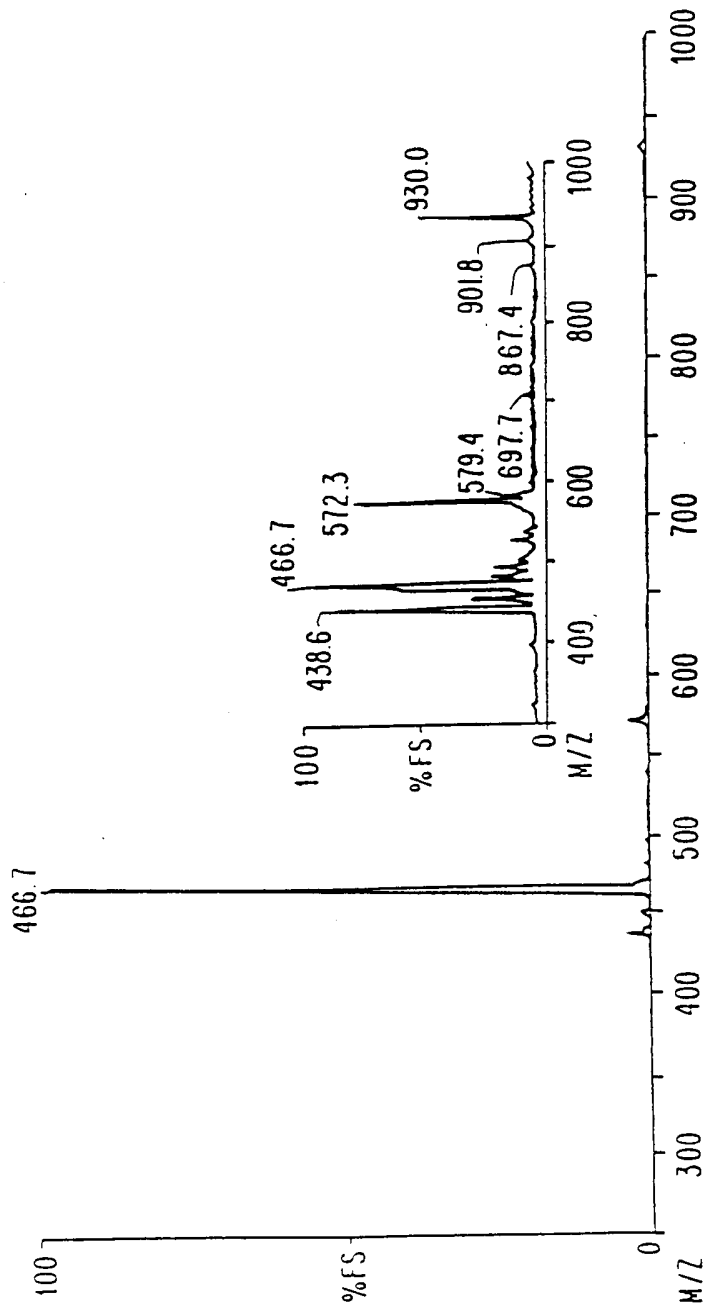
8. ÁBRA



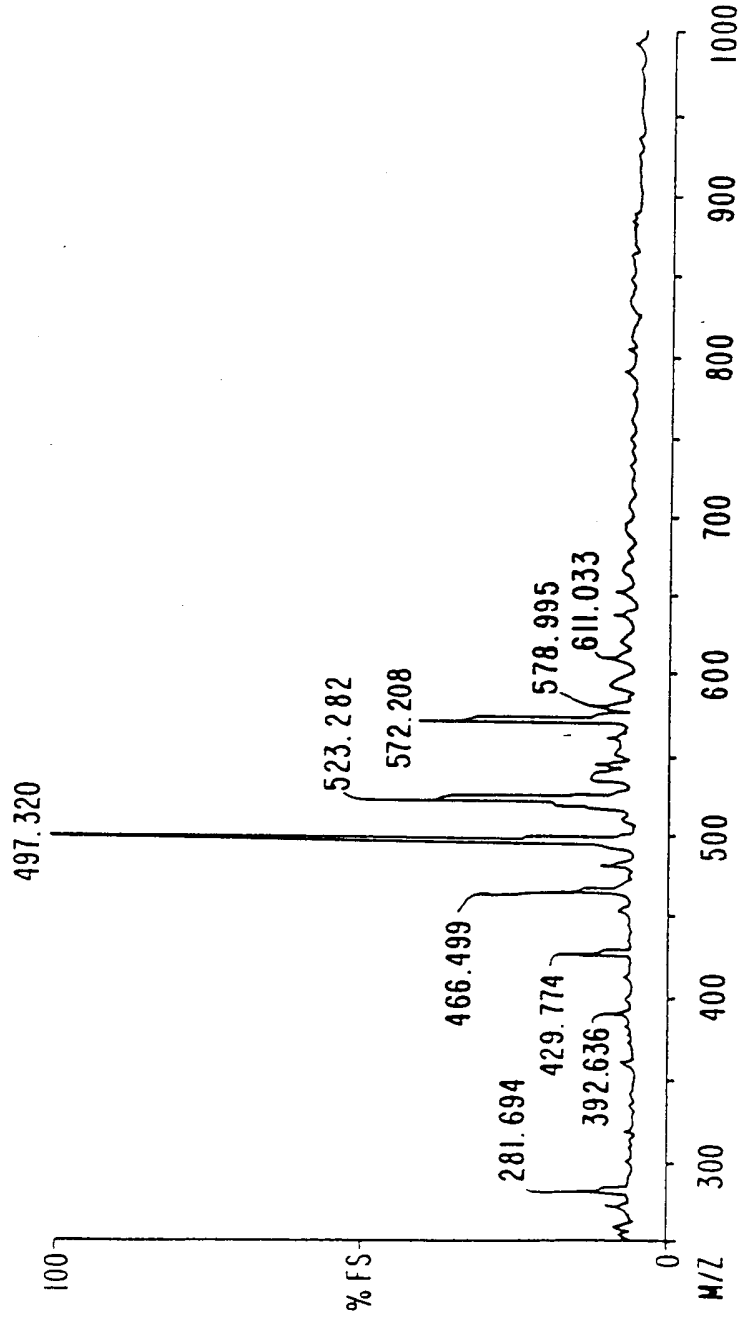
9. ÁBRA



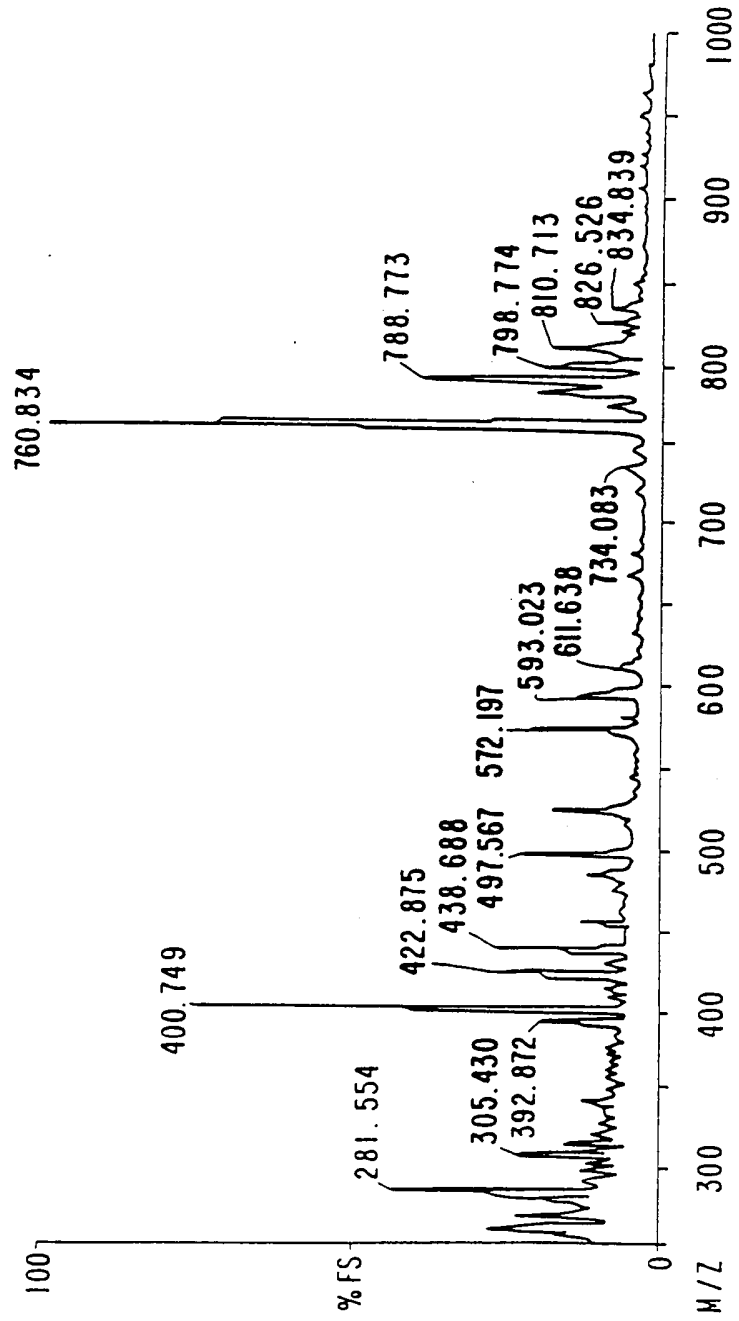
10. ÁBRA



11. ÁBRA



12. ÁBRA



13. ÁBRA