

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 913530 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 913530

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 15/08
A61K 39/002
G01N 33/569
C12P 21/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 16.01.1990

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 23.07.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 23.07.1991

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 16.01.1990 PCT/SE1990/000034
Internationell ansökan - International
application

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

24.01.1989 SE 8900243

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Aktiebolaget Astra, 151 85 Södertälje, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Ravi Kumar, B. V., Co-operative Society Ltd., INTIA, (IN)

2 • Suryanarayana, V., India, INTIA, (IN)

3 • Ravi, V., India, INTIA, (IN)

4 • Chandramukhi, A., India, INTIA, (IN)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

**Ekskretorisia/sekretorisia heisimato-(Cysticercus cellulosae)-antigeen eja, jotka ovat tarkoitettut käytettäväksi
immunodiagnoosissa ja rokote valmisteessa**

**Exkretoriska/sekretoriska bandmask-(Cysticercus cellulosae)-antigener för användning i immunodiagnosis och
vaccinationspreparat**

Ekskretorisia/sekretorisia heisimato-(Cysticercus cellulosae)-antigeeneja, jotka ovat tarkoitettut käytettäviksi immunodiagnoosissa ja rokotevalmisteissa

Exkretoriska/sekretoriska bandmask-(Cysticercus cellulosae)-
5 antigener för användning i immunodiagnosis och vaccinationspreparat

Cysticercus cellulosae, väkäsellisen sian kapean heisimadon,
10 Taenia solium, toukkamuoto voi infektoida ihmisen aivot jotta taen vakaviin neurologisiin oireyhtymiin, joita voidaan kuvata yhteisesti nimityksellä neurocysticercosis (NCC). Kystan sijainnista kallon sisässä riippuen tavataan usein seuraavia kliinisiä esiintymiä.

15

Sijainti	Kliininen oireyhtymä	Jälkitilat
Aivojen peruskudos	Epilepsia	
	Tilanhahmotus-	Motorisia tai
	häiriö (SOL)	sensorisia puutosoireita
Aivo- ja selkä- 25 ydinkalvot	Mielisairaus	
	Enkefaliitti	
	Krooninen meningiitti	Vesipää Aivohermo- halvauksia Motorisia tai sensorisia puutosoireita
30 Aivokammiot	SOL	Vesipää

Kaikkien tässä kuvattujen kliinisten oireyhtymien aiheuttajina voivat olla monet etiologiset tekijät, neurocysticercosiksen tavallisimman erotusdiagnoosin ollessa hermojärjestelmän Mycobacterium tuberculosis-infektiot. Tämän taudin
35 diagnoosi tehdään kallon röntgentutkimuksen perusteella. Kuolleet kalkkiutuneet kystat näkyvät tiheinä röntgensäteitä

läpäisemättöminä leesioina kallon röntgenkuvassa, kun taas elävät kystat näkyvät hypotiheinä tai hypertiheinä leesioina tietokonetomografiassa (CAT-SCAN). Viime aikoina on käytetty keskushermostojärjestelmän magneettiresonanssikuvausta (MRI) elävien kystien visualisoimiseen. Kystan identifioiminen missä tahansa näistä kuvausmenetelmistä riippuu suuresti kystan koosta ja ympäröivän isäntäkudoksen reaktiosta. Monissa kehitysmaissa, joissa tautia esiintyy yleisesti, kuvausmahdollisuudet ovat vaikeasti saavutettavissa, mikä luo akuutin tarpeen jostakin vaihtoehtoisesta yksinkertaisemmasta menetelmästä diagnoosin suorittamiseksi. Tarvittaisiinkin jokin immunodiagnostinen testi, jolla neurocysticercosis voitaisiin erottaa muista neurologisista sairauksista. Suurimmassa osassa olemassa olevista immunologisista testeistä pyritään paljastamaan vasta-aineita identifioitavan organismin antigeeneja vastaan. Lisäksi monet kokeet on kehitetty serodiagnostisiksi testeiksi, jotka ovat tarkoitettut käytettäväksi epidemiologisissa tarkastuksissa ja eikä näitä olemassa olevia kokeita ole tarkoitettu nimenomaan neurocysticercosiksen diagnosointiin.

Kokeen spesifisyys ja herkkyys riippuu laajalti kokeessa käytettävästä antigeenista. Esillä olevassa keksinnössä kuvataan erästä menetelmää *Cysticercus cellulosae*-antigeenien, jotka antavat immunodiagnoosille spesifisyyden ja herkkyyden, valmistamiseksi.

Tunnettu tekniikka antigeenin valmistuksessa ja immunodiagnoosissa

T. soliumin toukan käsittelemättömiä ekstrakteja on valmistettu kystan kokohomogenaateiksi (1) tai kystien kiinteiden osien, so. rakkulan seinämän ja scolexin tai ainoastaan rakkulan seinämän homogenaateiksi (2). Tietyissä tapauksissa on käytetty myös rakkulanestettä antigeenina (3). Tavallisesti homogenaatteja on sentrifugoitu solujäänteiden, tumien jne. poistamiseksi nopeudella 15 000-20 000 x g 15-30 minuuttia. Kokohomogenaatti on uutettu asetonilla suurimman osan lipi-

deistä poistamiseksi ja sitä on käytetty komplementtifiksatiokokeessa (4). Käsittelemättömiä eli kokoantigeeneja on käytetty monentyyppisissä immunoanalyyseissä, kuten passiivisessa hemagglutinatiokokeessa (5 ja 3), immunoelektroforeesissa (1) ja entsyymin avulla tapahtuvassa valkuaisaineiden immunokemiallisessa määrittämisessä [(ELISA) (1, 6 ja 7)].

Käyttämällä kystan kokohomogenaattia Kuhn ym. (8) ovat kuvanneet ELISA:a ja maininneet kokeen sensitiivisyyden johtuvan eräästä antigeenisarjasta proteiinien joukossa. Näitä antigeeneja ei puhdistettu eikä niitä testattu niiden spesifisyyden kannalta. Kokohomogenaatti sisältää antigeenisia lipidejä ja hiilihydraatteja proteiinien lisäksi, jotka visualisoitiin ja identifioitiin immunogeenisiksi western blotting-analyyseissä. Ei-proteiini-antigeenien osuutta ELISA:n kokonaisherkkyyteen ei verifioitu. ELISA:ssa käytettiin yhtä ainoata antigeenia, joka identifioitiin B-antigeeniksi, jolla osoittautui olevan fibronektiiniominaisuuksia, mutta herkkyys ei ollut tyydyttävä (9).

Loisen kokohomogenaatissa on useita haittoja, kun sitä käytetään antigeenina immunodiagnoosissa. (i) Se sisältää useita epitooppeja, jotka reagoivat immunologisesti ristiin muiden CNS-patogeenien (vide infra) kanssa. (ii) On osoitettu, että useissa loismadoissa esiintyy samoja ristiinreagoivia antigeeneja (10). Kehitysmaissa, kuten Intiassa, Meksikossa, Brasiliassa, Kiinassa, Thaimaassa ja Keski-Amerikan ja Aasian maissa, joissa loisinfektiot ovat väestössä erittäin tavallisia, huomattavan monissa ihmisissä on seerumin vastaaineita ristiinreagoivia antigeeneja vastaan. Kun tällaiset henkilöt sairastuvat tauteihin, jotka rikkovat veri-aivoesteen, seerumin vasta-aineet pääsevät aivo-selkäydinnesteseen (CSF) ja häiritsevät cysticercosis-diagnoosia antaen vääriä positiivisia tuloksia.

Kokohomogenaattien spesifisyyden puutteen vuoksi on pyritty identifioimaan ja puhdistamaan laji- ja kudosspesifisiä an-

tigeeneja eli scolexista ja rakkulanesteestä johdettuja antigeeneja. Kaksi polypeptidiä, joiden näennäismolekyyllipainot olivat noin 26 000 ja noin 8 000, on identifioitu *Taenia solium*in lajispesifisinä antigeeneina. Nämä antigeenit reagoivat immunoblot-analyysissä seerumin kanssa, joka oli saatu *Taenia solium*-infektoituneista potilaista, mutta ei sellaisten potilaiden, joilla oli muita loismatoinfektioita, seerumin kanssa (11). Näiden antigeenien herkkyyttä tai spesifisyyttä muihin CNC:ään liittyviin sairauksiin nähden ei ole vielä todennettu. Eräs antigeeni, joka oli puhdistettu rakkulanesteestä käyttäen monoklonaalista vasta-ainetta rakkulanesteen kokoproteiineja vastaan, on osoittautunut erittäin spesifiseksi immunodiagnoosissa, mutta siltä on puuttunut tarvittava herkkyyks, jotta se olisi käyttökelpoinen NCC:n paljastamisessa (12). Scolexspesifisillä proteiineilla, joiden näennäinen molekyyllipaino oli noin 80 000 ja noin 10 000 ja jotka oli puhdistettu käyttäen monoklonaalisia vasta-aineita, saatiin 100 % herkkyyks rakkulataudin serodiagnoosissa. Näitä antigeeneja on väitetty voitavan käyttää taeniaasin ja rakkulataudin erotusdiagnoosissa. Niiden käyttökelpoisuutta neurocysticercosiksen erotusdiagnoosissa muista systeemisistä rakkulataudeista ei ole testattu (13).

Kokohomogenaatin käytön epäedullisuutta antigeeninä voitaisiin vielä kuvata tutkimuksella, joka suoritettiin keksijöiden laboratoriossa (14). Yhteenvedo tästä tutkimuksesta on seuraavassa:

Kystat homogenoitiin ja altistettiin ääniaalloille (8x30 sekunnin pulsseja). Homogenaatit, jotka liuotettiin 1 %:iseen SDS:iin ja käsiteltiin 1 %:isella β -merkapttoetanolilla 100°C:ssa, geelisuodatettiin Sephacryl S-300-kolonnissa kolmeen fraktioon:

Fraktio I : kysta-antigeenit, joiden molekyyllipaino > 66 kDa
Fraktio II : kysta-antigeenit, joiden molekyyllipaino välillä 25-66 kDa

Fraktio III: kysta-antigeenit, joiden molekyylipaino väliltä 14-35 kDa

Kuvio 1: Kolme geelisuodatuksessa saatua huippufraktiota

- 5 analysoitiin 10 % SDS-PAGE:lla. Kaista 1: 3. huippu; kaista 2: 2. huippu; kaista 3: 1. huippu; kaista 4: Mr-merkkiaineet (94, 67, 43, 30, 20,1 & 14,1 kDa). Kolmen fraktion Mr-alueet annetaan tekstissä.
- 10 ELISA suoritettiin seuraavalla tavalla käyttäen edellä mainittua kolmea cysticercusantigeenifraktiota:
- 150 CSF:ää, jotka oli koottu satunnaisesti eri neurologisilta potilailta, testattiin näitä kolmea fraktiota vastaan. Antigeenit siveltiin Dynatechin 96:n syvennyksen mikrotiiterilevyille 5 µm:n/ml konsentraatioina (100 µl/syvennys)
- 15 50 mM bikarbonaattipuskurissa, pH:n ollessa 9,6, yön yli, sammutettiin 2 % BSA:lla ja CSF:t testattiin 1/25, 1/125 ja 1/625 laimennoksina. Sitoutuneet ihmis-IgG paljastettiin käyttämällä kaniini-anti-ihmis-IgG-peroksidaasikonjugaattia
- 20 (Sigma: 1:1000 laimennos). Ortofenyleenidiamiinia käytettiin kromogeenina (4 mg/10 ml) ja 0,3 % H₂O₂:a substraattina.

Taulukkoon 1 on koottu näiden 150 näytteen tulokset.

Taulukko 1

S1 N:o	Diagnoosi	Tapauksien lukumäärä	Fraktio			Fraktio		
			+++	++	+	+++	++	+
						II		III
								xxx xx x
1.	Cysticercosis, CAT-SCAN:lla todettu	6	6	-	-	4	2	-
2.	Tuberkuloottinen meningiitti (TBM) viljelyllä todettu	11	5	4	1	4	3	4
3.	TBM voimakkaasti epäilty	24	3	5	4	4	1	5
4.	Krooninen meningiitti, etiologia ei jäljitettävissä	20	-	5	4	-	4	5
5.	Märkäinen meningiitti, viljelyllä todettu	7	-	-	-	-	-	-
6.	Multippeliskleroosi, ruotsalais- näytteitä	30	-	-	-	-	-	-
7.	Aivokasvaimia							
	+ Dementiaa							
	+ Epilepsiaa							
	+ Virusperäistä enkefaliittia	52	-	-	-	-	-	-

+++ CSF:t +ve (positiivinen) 1/625 laimennokseen asti; ++ CSF:t +ve vain 1/125 laimennokseen asti;
+ CSF:t +ve vain 1/25 laimennokseen asti. Ryhmien 2, 3 ja 4 keskimääräiset absorbenssit 490 nm:llä
ovat 3-5 kertaa alaisemmat kuin ryhmän 1.

Näistä tiedoista tehtiin seuraavat johtopäätökset. Vaikka koe oli riittävän herkkä tunnistamaan kaikki neurocysticercosis-tapaukset, tuberkuloottinen meningiitti antoi maksimimäärän vääriä positiivisia tuloksia. Sen vuoksi koetta ei
5 voida käyttää silloin, kun molemmat taudit ovat yleisiä.

Tuberkuloottista meningiittiä sairastavien CSF:ien reaktiot kysta-antigeenien kanssa osoittautuivat johtuvan mykobakteeriantigeenien ja kysta-antigeenien ristiinreagoinnista.

10

1. Mycobacterium tuberculosis-sonikaatit estivät cysticercosis-positiivisten CSF:ien sitoutumisen kysta-antigeeneihin, mutta eivät kokonaan estäneet reaktiota.

2. Tämä estovaikutus kasvoi mykobakteeriantigeenien konsentraatioiden kasvun myötä.
15

3. Kaniinin antiseerumit, jotka oli kehitetty mykobakteerisonikaatteja vastaan, reagoivat kysta-antigeenien kanssa.

Edellä esitettyt huomiot osoittivat, että käsittelemättömät
20 antigeenit todella sisälsivät epitooppeja, jotka ristiinreagoivat muiden CNS-patogeenien kanssa.

Cysticercukset ovat monisoluisia organismeja, joita ei voida fagosytisoida ja prosessoida makrofageilla tai granulocyteilla tai muilla antigeeneilla, joiden solut ovat erilaisia kuin yksisoluisien mikro-organismien. Sen vuoksi ihmisen immuunijärjestelmä harvoin herkistyy kaikille parasiittien proteiineille, etenkin sellaisessa immunologisesti ensisijaisessa osastossa kuin keskushermosto, CNS. Niinpä antigeenit, joita nämä loismadot sekretoivat tai ekskretoivat
30 tai vuodattavat isännän kudospaineteisiin, (nimitetään E-S-antigeeneiksi), ovat immunologisesti erittäin tärkeitä. Monia loismato-E-S-antigeeneja on saatu pitämällä loismatojen eri kehitysvaiheita in vitro kudospainetyväliaineissa ja puhdistamalla antigeenit kasvatusväliaineesta (15). Cysticercus cellulosae-toukkia on viljelty myös in vitro seerumin ja kudosekstraktien kanssa (16). Pitämällä näitä parasiitteja
35

lyhyitä aikoja Dulbeccon minimiessentiaaliväliaineessa (DMEM) tai fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) ja antamalla näille parasiiteille C-aminohappopulsseja, osoitettiin, että ne olivat metabolisesti aktiivisia (17). Kuitenkin väliaineessa detektoitiin vain merkityksettömiä määriä radioaktiivisesti leimattuja proteiineja. Näiden antigeenien käyttökelpoisuutta immunodiagnoosissa ei ole koskaan testattu.

Tämä keksintö perustuu siihen lähtöajatukseseen, että *Cysticercus cellulosae*-E-S-antigeenit, joita saadaan viljelemällä parasiitteja in vitro, voivat liittyä läheisesti antigeeneihin, jotka erittyvät kystasta osana kystan metaboliaprosessia in vivo. Siten ne saattavat antaa spesifisyyttä ja herkkyttä immunodiagnostisille kokeille, joilla on tarkoitus todeta vasta-aineita potilaiden kudostesteissä, kuten CSF:ssä ja seerumissa. Samoja antigeeneja tai näiden antigeenien joitakin hajotustuotteita voidaan todeta potilaiden CSF:ssä. Tämä voisi muodostaa perustan antigeenidetektioon perustuvan immunodiagnostiikan kehittämiseksi. On selvää, että on mahdollista kehittää polyklonaalisia monospesifisiä tai monoklo-naalisia vasta-aineita E-S-antigeeneja vastaan ja niitä voitaisiin sitten käyttää tällaisessa antigeenin detektiotes-tissä. Koska eräät näistä antigeeneista voivat antaa isännälle suojaavan immunitetin, näitä antigeeneja voidaan käyttää rokotteiden kehittämiseen *Cysticercus cellulosae*n aiheuttamien infektioiden neutraloimiseksi.

Esillä olevassa keksinnössä kuvaamme uutta menetelmää *Cysticercus cellulosae*n viljelemiseksi seerumittomassa soluviljelyväliaineessa pitkiä aikoja ja parasiittien väliaineessa muodostamien antigeenien käyttämiseksi NCC:n immunodiagnoosissa, jossa menetelmässä potilaiden CSF:n ja E-S-antigeenien annetaan vaikuttaa toisiinsa. Tässä korostetaan antigeenien käyttöä NCC:n identifioimiseen ilman minkään muiden systeemisen cysticercosiksen muotojen häirintää. Tässä kuvattua uutta diagnoosimenetelmää voidaan käyttää myös ihmi-

sen ravinnoksi tarkoitettujen sikojen *Cysticercus cellulosae*-infektion diagnosoimiseen.

Kystien lähde ja viljely:

5 sianlihasta peräisin olevia lihaksia, joissa on cysticercuksia, saadaan teurastamosta. Sian lihas pyyhittää pinnalta puhtaaksi kontaminaatioista etanolilla. Kystat leikataan irti ehjinä rikkomatta rakkulan seinämää (jos se rikkoutuu, kystaa ei käytetä) ja sijoitetaan suolaliuokseen, joka si-
10 sältää penisilliini G:tä 1000 yksikköä/ml, gentamysiiniä 40 µg/ml ja amfoterisiini B:tä 5 µg/ml. Kystat pestään huolellisesti steriilillä suolaliuoksella, joka sisältää antibiootteja kuten edellä. Sitten ne pestään seerumittomalla väliaineella RPMI 1640 tai Eagles-MEM:llä ja Earlesin suo-
15 lalla tai Hankin suolalla. Kystat sijoitetaan RPMI 1640:een tai Eagles-MEM-liuokseen, joka sisältää penisilliini G:tä 1000 yksikköä/ml ja gentamysiiniä 40 µg/ml 37°C:ssa kaasukehän sisältäessä 5 % CO₂:a.

20 E-S-antigeenin talteenotto:

väliaine vaihdetaan ja heitetään pois ainakin kahdesti ensimmäisten 24-60 tunnin aikana isäntäkomponenttien täydellisen poistumisen varmistamiseksi. Väliaine on sopivaa korvata uudella kahdesti ensimmäisen 48 tunnin aikana. Väliaine otetaan talteen sen jälkeen määrätyn väliajoin, kunnes kystat alkavat evaginoitua. Käytännön syistä väliaine on sopivaa ottaa talteen 24 tunnin välein. Kystien elinkykyisyys nähdään tarkastelemalla rakkulan seinämien supistumista, joka voidaan havaita käänteismikroskoopilla. Evaginaatiota havaitaan 6. vuorokaudesta lähtien. Pian väliaineen talteenottamisen jälkeen se sentrifugoidaan nopeudella 104 000 x g
30 60 minuuttia mahdollisten liukenemattomien jäänteiden ja kalvokontaminaatioiden poistamiseksi. Supernatanttiin lisätään parametyylisulfonyylifluoridia (2 mM), parakloorielohopeabentsoaattia (0,06 %) ja ammoniumsulfaattia 90 %:n kyl-
35 lästymisasteeseen saakka samalla pitäen liuoksen pH:n arvossa 7-7,4. Saostus suoritetaan 4°C:ssa ja sen jälkeen otetaan

talteen sentrifugoimalla nopeudella 15 000 x g 30 minuuttia 4°C:ssa. Sakka liuotetaan 50 mM natriumfosfaattipuskuriin, jonka pH on 7,4 ja dialysoidaan perusteellisesti samaa puskuriliuosta vastaan useasti vaihtaen 48 tuntia. Vaihtoehtoisesti kalvofragmentit voidaan poistaa muilla alalla tunnetuilla menetelmillä, kuten kalvosuodatuksella. Samaten anti-geenit voidaan eristää muilla menetelmillä, kuten ultrasuodatuksella. Liuoksen UV-spektri osoittaa maksimiabsorption 278-280 nm:n kohdalla. Schaffnerin ja Weissmannin (18) nettelytavalla arvioitu proteiinisaanto on 25-35 µg proteiinia/kysta/24 tuntia, kun kystia inkuboidaan parasiittitiheydellä 15 kystaa/10 ml.

Kuviossa 2 on esitetty näiden proteiinien natriumdodekyyli-
 15 lisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE) Coomassie Blue R-värjäyksellä.

Kuvio 2: E-S-proteiinien Coomassie Blue-värjäys analysoituna 7,5-15 % gradientilla SDS-PAGE-menetelmällä. Kaista 1: High
 20 Mr-markkereita (116, 97,4, 66, 45 ja 29 kDa); kaistat 2 ja 3: kahden erillisen valmisteen ammoniumsulfaatilla saostettuja E-S-proteiineja; kaista 4: Low Mr-markkereita (94, 67, 43, 30,20,1 ja 14,4 kDa).

25 Useimmat havaitut proteiininauhat ovat noin 97 000, 66 000, 50 000, 38 000, 28 000 näennäismolekyylipainon kohdalla ja erottamaton proteiiniseos molekyylipainoalueella 10 000-14 000 daltonin kohdalla. Joukko pienempiä kaistoja on myös havaittavissa.

30

Osoitus E-S-proteiinien de novo-synteesistä:

Kystat siirrettiin ensimmäisen 48 tunnin väliaineessa pitämisen jälkeen metioniinidefisienttiin väliaineeseen, joka sisälsi ³⁵S-metioniinia 40 µCi/kysta. Kystat ja väliaine-
 35 näytteet otettiin eri ajankohtina. Kystat leikattiin rakulan seinämiksi ja scolexiksi ja homogenoitiin. Homogenaatit analysoitiin 12 % SDS-PAGE-menetelmällä ja niille suoritet-

tiin flourografia. Väliaine saostettiin asetonilla ja analysoitiin 12 % SDS-PAGE-menetelmällä ja sille suoritettiin flourografia. ³⁵S-metioni liittyi aktiivisesti sekä rakkulan seinämä- että scolex-proteiineihin.

5

48 Tunnin kuluessa väliaineessa esiintyi useita proteiineja (kuvio 3).

Kuvio 3: ³⁵S-metioniinilla merkittyjen ekskretoristen/sekretoristen proteiinien autoradiogrammi. 3 Kystaa inkuboitiin erikseen 1 ml:ssa väliainetta, jotka kaikki sisälsivät 40 µci ³⁵S-metioniinia, 48 tuntia. Väliaine otettiin talteen, ultrasentrifugoitiin ja supernatantti saostettiin asetonilla. Kukin kaista edustaa yhdestä kystasta peräisin olevaa proteiinia.

15

Kuten kuviosta 3 näkyy, useita proteiineja syntetisoitui aktiivisesti ekskretoituina/sekretoituina väliaineeseen osana parasiitin metabolista toimintaa.

20

Kun kystia pidetään in vitro seerumittomassa väliaineessa osana metabolista uudelleenjärjestymistä eräitä proteiiniantigeeneja ilmestyy väliaineeseen joko ekskretorisen tai sekretorisen prosessin tuloksena. Nämä antigeenit, jotka otettiin talteen ennen scolexin evaginaatiota, edustavat toukka-asteen antigeeneja. Keksinäkö koskee antigeeneja, menetelmää niiden valmistamiseksi ja niiden käyttöä NCC:n diagnoosissa ja mahdollisesti prognoosissa sekä niiden aiottua käyttöä rokotteen valmistamisessa *Cysticercus cellulosae*-infektiota vastaan. Tässä kuvattua diagnostista menetelmää voidaan käyttää myös rakkulataudin diagnosointiin ihmisravinnoksi tarkoitetuissa sioissa.

25

30

Tällainen modifioitu muoto voisi olla esimerkiksi polyetyleeniglykolikytkentä tai ristikytkentä muihin proteiineihin tai bifunktionaalisiin reagensseihin tai digestio proteaaseilla. Keksinäkö koskee myös ihmisen aktiivivaiheessa olevan

35

NCC:n diagnosointimenetelmää, jossa diagnosoitavan ihmisen CSF:n annetaan vaikuttaa ainakin yhden in vitro inkuboidun *Cysticercus celluloosa*en ekskretoidun tai sekretoidun anti-geenin, jonka näennäismolekyyllipaino on SDS-PAGE-menetelmällä määritettynä noin 97 000 tai 66 000 tai 50 000 tai 38 000 daltonia, tai mainittujen antigeenien seoksen kanssa.

Esimerkit

Esimerkit 1 ja 2 koskevat näiden antigeenien käyttökelpoisuutta ELISA-systeemissä anti-cysticercosis-vasta-aineiden detektoimiseksi erilaisia neurologisia sairauksia potevien potilaiden CSF:ssä. Esimerkit 3 ja 4 koskevat tärkeiden antigeenien identifioimista myöhemmin niiden molekyyllipainon perusteella immunosaostuksessa käyttämällä potilaiden CSF:ä.

Esimerkki 1

Keksinnön mukaisilla sekretorisilla/ekskretorisilla proteiineilla siveltiin Dynatechin 96 syvennystä käsittäviä mikrotiitterilevyjä konsentraation ollessa 5 µg proteiinia/ml (100 µl/syvennys) ja annettiin olla yön yli huoneenlämpötilassa. Levyjen muut proteiinien sidospaikat huuhdeltiin 2 % härän seerumialbumiinilla (BSA) PBS:ssä. CSF:t laimennettiin 1/25, 1/125 ja 1/625 -suhteisiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, joka sisälsi 0,05 % Tween-20:ä (PBST), ja niitä inkuboitiin 2 tuntia 37°C:ssä. Inkuboinnin jälkeen syvennykset pestiin kolmesti PBST:llä. Kaniinin anti-ihmis-IgG-peroksidaasikonjugaattia laimennettuna PBST:llä suhteessa 1:1000 käytettiin tilavuusmääränä 100 µl/syvennys ja inkuboitiin 2 tuntia 37°C:ssä, minkä jälkeen syvennykset pestiin kolmesti PBST:llä. Sitoutunut konjugaatti havaittiin 20 minuutissa käyttäen ortofenyleenidiamiinia kromogeenina (4 mg/10 ml) ja H₂O₂:a substraattina. Reaktio pysäytettiin 50 µl:lla 4 N H₂SO₄:a ja absorbenssi 490 nm:n kohdalla määritettiin Dynatechin MR 700 ELISA:n lukijalla. Kaikki absorbenssiarvot, jotka olivat suurempia kuin 0,10 CSF:n 1/100-laimennoksessa, katsottiin positiivisiksi.

Taulukko 2 sisältää tulokset.

Taulukko 2

5	Diagnoosi	Näytteiden lukumäärä	Positiivisia
10	Cysticercosis Kuoleman jälkeen todettuja Kirurgisesti todettuja Kliinisesti epäiltyjä	2 2 7	1 2 6
15	Japanilainen enkefaliitti IgM sieppaus ELISA +ve	30	0
20	Tuberkuloottinen meningiitti Viljelyllä todettuja + kirurgisesti todettuja	25	0
25	Tuberkuloottinen meningiitti (joko Ag-+ve tai vasta-aine-+ve)	71 absorbenssi=0,15 490 nm	2

- 30 Edellä oleva taulukko osoittaa, että tämä antigeeni on parempi kuin raaka antigeeni ja antaa spesifisyyttä immunologiselle reaktiolle.

Esimerkki 2

- 35 Tämä esimerkki kuvaa ekskretoristen-sekretoristen antigeenien diagnostista arvoa koskevaa kaksoissokkoetta, jossa kokeen rakenne eliminoi koetta suorittavan tutkijan ennakkoodotukset.
- 40 37 CSF-näytteelle, jotka oli saatu potilaista, joilla oli erilaisia diagnosoituja neurologisia sairauksia, annettiin järjestysnumerot 1-37, minkä suoritti puolueeton tarkkailija, joka oli muu kuin keksijät. Näytteistä tehtiin kolmen sarjan alikvootit. Kaksi keksijöistä riippumatonta laboratoriota sai CSF-näytteet ja kaksi henkilöä kummassakin laboratoriossa eli yhteensä 4 henkilöä suoritti ELISA-analyysin

toisistaan riippumatta kuten edellä esimerkissä 1 yksityiskohtaisesti kuvattiin. Kaikki neljä tutkijaa taulukoivat tulokset ja tiedottivat tulokset puolueettomalle tarkkailijalle. Kaikkien neljän tutkijan tulokset olivat samanlaiset ja ne on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

	10	Diagnoosi	Näytteiden lukumäärä	Positiivisia
		Neurocysticercosis	3	3
	15	Selkäydinpuudutus (normaalikontrollit)	8	0
		Leikkauksen jälkeinen meningiitti (viljelyllä todettu)	5	0
	20	Japanilainen enkefaliitti	7	0
		Märkäinen meningiitti (pneumokokki)	3	0
	25	Cryptokokki-meningiitti (viljelyllä todettu)	1	0
		Tuberkuloottinen meningiitti (viljelyllä todettu)	2	0
	30	Thoraxin selkäytimen puristuminen	2	0
		Kallon ja selkärangan liitoskohdan poikkeavuus	1	0
	35	Nikaman välilevyn ulospullistuminen	1	0
		Liikehermon sairaus	1	0
	40	Ataksinen neuropatia	1	0
		Hemiflegia	1	0
	45	Pseudoydinjatkoshalvaus	1	0

Edellä olevat tulokset osoittavat, että ekskretoriset-sekretoriset antigeenit voivat antaa 100-prosenttisen herkkyyden

ja 100-prosenttisen spesifisyyden diagnostiseen testiin, joka on tarkoitettu vasta-aineiden detektoimiseen potilaiden CSF:ssä.

5 Esimerkki 3

Edellä tässä keksinnössä kuvatut ekskretoriset/sekretoriset antigeenit merkittiin ^{125}I :llä käyttäen jodogeenistä menetelmää. Merkittyjä proteiineja inkuboitiin tunnistettua neurocysticercosista, tuberkuloottista meningiittiä ja erilaisia
 10 muita neurologisia sairauksia sairastavien potilaitten CSF:n kanssa. Immuunikomplekseja heikennettiin kaniinin anti-ihmis-IgG:llä, kantajana ihmis-IgG ja koko liuos sekoitettiin 2,5 % polyetyleeniglykoliin. Sakat analysoitiin 7,5-15 %
 15 gradientilla SDS-PAGE-menetelmällä ja niille suoritettiin autoradiografia (kuvio 4).

Kuvio 4: ^{125}I -merkittyjen sekretoristen/ekskretoristen proteiinien ja potilaitten CSF:ien immunosakkojen autoradiogrammi. CSF (30 μl) 1:3 laimennoksina inkuboitiin E-S-proteiinien kanssa (3x10 iskua/min) ja immuunikomplekseja saostettiin kuten tekstissä selitetään. Kaista 1: Vertailu-n:o CSF;
 20 kaistat 2, 3 ja 4 neurocysticercosis-potilaitten CSF; kaista 5: tuberkuloottista meningiittiä sairastavien CSF ja kaistat 6 ja 7: muita neurologisia sairauksia.

25

Merkille pantavaa on, että proteiinit, joiden näennäismolekyyllipaino oli noin 97 kDa, 66 kDa, 50 kDa ja 38 kDa, putosivat immunosaostuksessa.

30 Esimerkki 4

E-S-proteiineja, jotka oli merkitty ^{35}S -metioniinilla pitämällä kystia in vitro metioniinidefisiitissa väliaineessa, joka sisälsi ^{35}S -metioniinia, immunosaostettiin CSF-vasta-
 35 aineiden kanssa, kuten esimerkissä 2 mainittiin. Immunosakkojen SDS-PAGE-flourografia on esitetty kuviossa 5.

Kuvio 5: Autoradiogrammi ³⁵S-merkityistä E-S-proteiineista, jotka immunosaostettiin erilaisia neurologisia sairauksia sairastavien potilaitten CSF:n kanssa. Kaistat 9 ja 5 edustavat NCC-potilaitten CSF:sta saatuja immunosakkoja. Kuten esimerkiksi 3, myös tässä 97, 66 ja 50 kDa:n proteiinit immunosaostuivat.

Antigeenin, jonka näennäismolekyyllipaino on 97 000, karakterisointi

10 I. Osittaisnukleiinihapposekvenssi:

Cysticercus celluloosan kokonaispoly-A + RNA:sta rakennettiin lambda gt 11 cDNA. Käyttäen hyperimmuunin kaniinin serumia, joka oli kehitetty paramyosiinia vastaan, joka oli puhdistettu Schistosoma mansoniasta, identifioitiin ja eristettiin noin 2,5 kb:n cDNA-kloonin. Kaksisäie-DNA-sekven-

15 toinnissa (20) saatiin seuraava sekvenssi:

1. TCTCAAGCAGXACGTCACTGACAGTACATATGTACTGACTCTGCTTCACA
TATTATATTAGTTACTAGCAAGCACACACACGTCGAC

2. TGAGTACGTCXTGTAGTCTCGTATGTGTGTAGTTCTGTCGTXGAATCACTAACTTA
20 ATATTAGAGTCAGXAGGTCAGTGTTCATGTTCATGTAT

II. Osittaisaminohapposekvenssit

Antigeeni, jonka näennäismolekyyllipaino on 97 000, elektro-

25 eluoitiin Coomassie Blue väriaineesta SDS polyakryyliamidi-

geeleillä, joilla E-S-antigeeneille suoritettiin elektrofo-

reesi (21). Elektroeluoitu proteiini saostettiin liuottimel-

la SDS:n poistamiseksi. Sitten proteiinille suoritettiin

digestio TPCK-käsitellyllä trypsiinillä. Trypsiinillä tuote-

tut peptidit erotettiin RP300 (C8) kolonnilla (0,46 x

30 25 cm), joka tasapainotettiin liuottimella A (0,1 % TFA ve-

dessä). Peptidi eluoitiin liuottimen B lineaarisella gra-

dientilla (70 % asetonitriiliä, joka sisälsi 0,058 % TFA)

0-65 %:iin 40 minuutin kuluessa. Peptidejä sisältävät frak-

tiot haihdutettiin kuiviksi vakuuissa. Näitä peptidejä käy-

35 tettiin sekventointiin.

Taulukko 4

Eräiden antigeenista, jonka näennäismolekyyllipaino oli
 5 97 000, johdettujen trypsiinillä tuotettujen peptidien
 aminohapposekvenssit

	Aminohapposekvenssi	Peptidi
	V K L D S A K	T 14
10	A T Q T E V W R	T 19
	V Y S T S T K	T 16
	Y A F L - A S V T - S R	T 21
	S L L D F R S T R	T 11

15

Viitejulkaisut:

1. Espinoza, B. ym. (1982) julkaisussa A. Flisser ym.
 (toim.) Cysticercosis, Present state of knowledge and pers-
 pectives, 163-170, Academic Press, New York.
- 20 2. Rosas, N. ym. (1986), Arch. Neurol., 43, 353-356.
3. Larralde, C. ym. (1986) julkaisussa Am. J. Trop. Med.
 Hyg., 35, 965-974.
4. Neito, D., (1956), Neurology, 6, 725-738.
5. Powell, S.J. ym. (1966), Ann. Trop. Med. Parasitol, 60,
 25 152-158.
6. Diwan, A.R. ym. (1982) Am. J. Trop. Med. Hyg., 31, 364-
 369.
7. Estrada, J.E. ja Kuhn, R.E. (1985) J. of Neurol. Scien-
 ces, 71, 39-48.
- 30 8. Kuhn, R.E. ym. US-patenttijulkaisu n:o 4,740,456 (1988).
9. Espinoza, B. ym. (1986), J. Clin. Microbiol., 24, 536-
 541.
10. Espinoza, B. ja Flisser, A. (1987) Arch. Investigative
 Medicine, 17 (3) 299-312.
- 35 11. Gottestein, B. ym. (1987) Trop. Med. Parasit., 38, 299-
 303.
12. Kim, S.I. ym. (1986) Korean J. Parasitol., 24, 145-158.

13. Nascimento, E. ym. (1987), J. of Clin. Microbiol., 25, 1181-1185.
14. Suryanarayana, V. ym. (1987), Abstract No. SVIIA-5, 37th Annual Conference of the Neurological Society of India, Hyderabad.
15. Lightowers, M.W. ja Rickard, M.D., Parasitology (1988), 96, S123-S166.
16. J. Sotelo ym., J. Am. Med. Assoc. (1986), 256, 893.
17. Diaz De Leon, L. ym. (1982) julkaisussa A. Flisser ym. (toim.) Cysticercosis Present State of Knowledge and Perspectives, 465-475, Academic Press, New York.
18. Schaffner, W. ja Weissmann, C., (1973), Anal. Biochem., 58, 502-514.
19. Huynh, T.V., Young, R.A. ja Davis, R.W., (1985) julkaisussa DNA cloning, volyymi 1, A Practical Approach, toim. Glover, D.M., ss. 49-78, IRL Press, Washington.
20. Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H. ja Brow, M.A.D., (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 9436-9440.
21. Hunkapiller, M.W. ja Lujan, E. julkaisussa Methods in Protein Micro Characterization, toim. Shivley, J.E., (1986) ss. 89, Humana Press.

Patenttivaatimukset

1. Ekskretoristen/sekretoristen (E-S) Cysticercus cellulosae-antigeenien käyttö neurocysticercosiksen immunodiagnoosissa, **tunnettu** siitä, että antigeenit voidaan saada
5 käyttäen Cysticercus cellulosaen kasvatusta in vitro ja ne eivät oleellisesti ristireagoi Tuberculosis meningitis -antigeenin kanssa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä,
10 että käytetään antigeeneja, joiden näennäinen molekyylipaino on noin 97 000 tai 66 000 tai 50 000 tai 38 000.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä,
15 että käytetään antigeeneja, joiden näennäinen molekyylipaino on 66 000 ja 38 000.
4. Jonkin patenttivaatimuksista 1, 2 tai 3 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että immunomääritys on tarkoitettu vasta-
20 aineiden detektoimiseen potilaiden kudospainoista, kuten CSF:stä ja seerumista.
5. Jonkin patenttivaatimuksista 1, 2 tai 3 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että immunomääritys on tarkoitettu antigeenin
25 detektoimiseen potilaiden kudospainoista, kuten CSF:stä ja seerumista.
6. Cysticercus cellulosaen ekskretoima/sekretoima antigeeni, **tunnettu** siitä, että sen näennäinen molekyylipaino on
noin 97 000 tai 66 000 tai 50 000 tai 38 000 daltonia SDS-
30 PAGE:llä määritettynä, ja se ei oleellisesti ristireagoi Tuberculosis meningitis -antigeenin kanssa.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen antigeeni, **tunnettu** siitä, että se on glykoproteiini, jonka näennäinen molekyylipaino
35 on noin 97 000 tai 50 000 SDS-PAGE:lla määritettynä, ja se ei olennaisesti ristireagoi Tuberculosis meningitis -antigeenin kanssa.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen antigeeni, **tunnettu** siitä, että proteiini, jonka näennäinen molekyylipaino on noin 38 000, käsittää osittaisen aminohapposekvenssin valiini-glutamiinihappo-tyrosiini-treoniini-kysteiini-treoniini (VE-YTCT), ja se ei oleellisesti ristireagoi Tuberculosis meningitis -antigeenin kanssa.

9. Jonkin patenttivaatimuksista 6, 7 tai 8 mukaisen antigeenin käyttö rokotteen valmistukseen Cysticercus cellulosae -infektiota vastaan.

10. Menetelmä patenttivaatimuksissa 6, 7 tai 8 määritellyn antigeenin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

- 15 a) viljellään käsittelemättömiä ja ehjiä cysticercuksia, jotka on saatu infektoituneesta sian lihaksesta, in vitro seerumittomassa soluviljelykasvatusliuoksessa, joka sisältää antibiootteja,
- b) poistetaan kaikki antigeenit viljelyn ensimmäisen 24-60
- 20 tunnin aikana vaihtaen toistuvasti väliaineen,
- c) otetaan peräjälkeen talteen väliainetta määrätyn väliajoin evaginaatioon saakka,
- d) poistetaan mahdolliset kalvofragmentit ja
- e) eristetään antigeenit.

25

11. Menetelmä ihmisen aktiivivaiheessa olevan NCC:n diagnosoimiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää: diagnosoitavan ihmisen CSF:n saattamisen alttiiksi ainakin yhden in vitro viljellyn Cysticercus cellulosae:n ekskreetoiman tai sekretoiman antigeenin, jonka näennäinen molekyylipaino on SDS-PAGE:llä määritettynä noin 97 000 tai 66 000 tai 50 000 tai 38 000 daltonia, tai mainittujen antigeenien seoksen vaikutukselle, jotka antigeenit eivät oleellisesti ristireagoi Tuberculosis meningitis -antigeenin kanssa, ja

35 detektoidaan mahdollinen Cysticercus cellulosae -infektio.

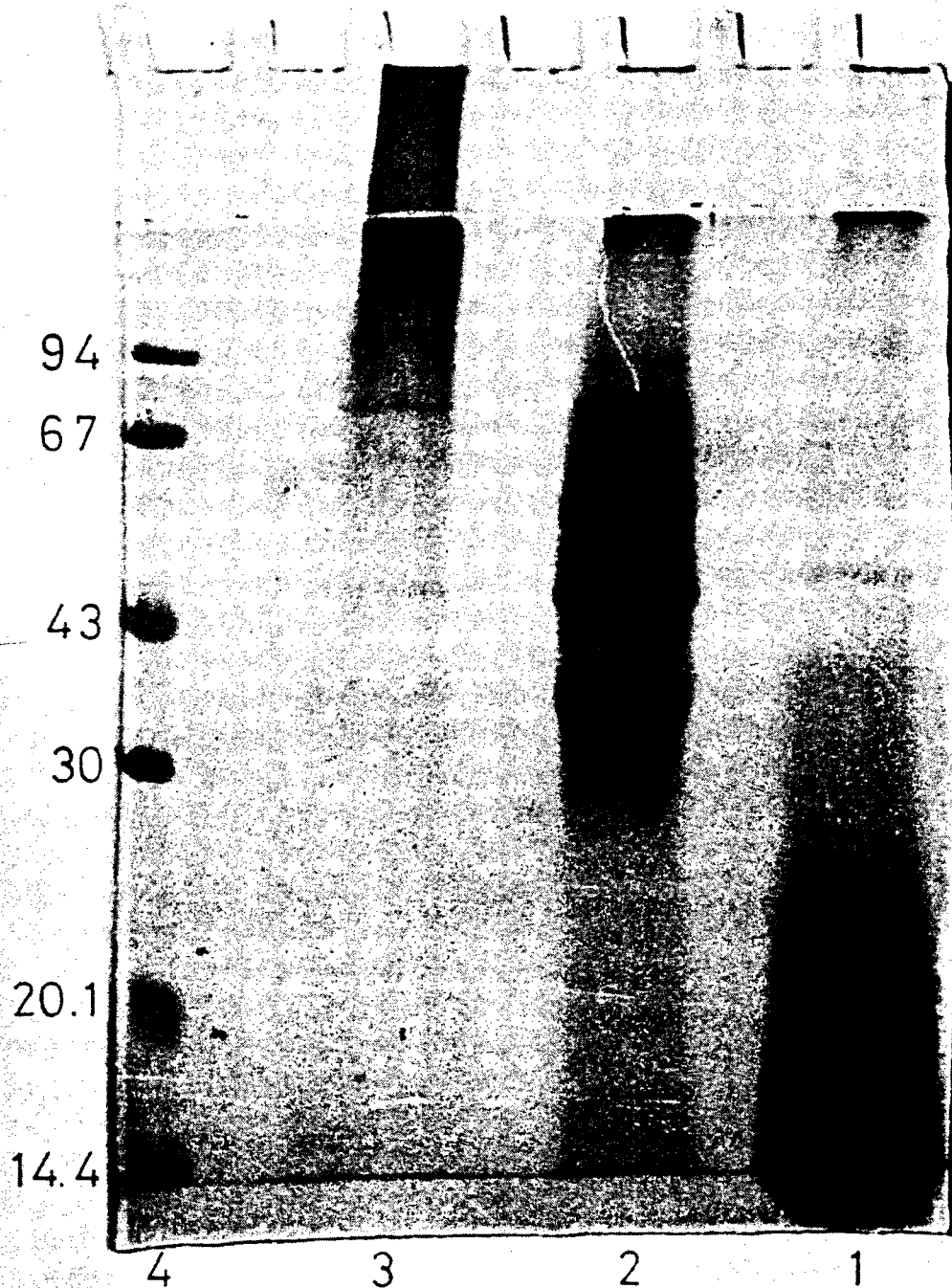


Fig. 1

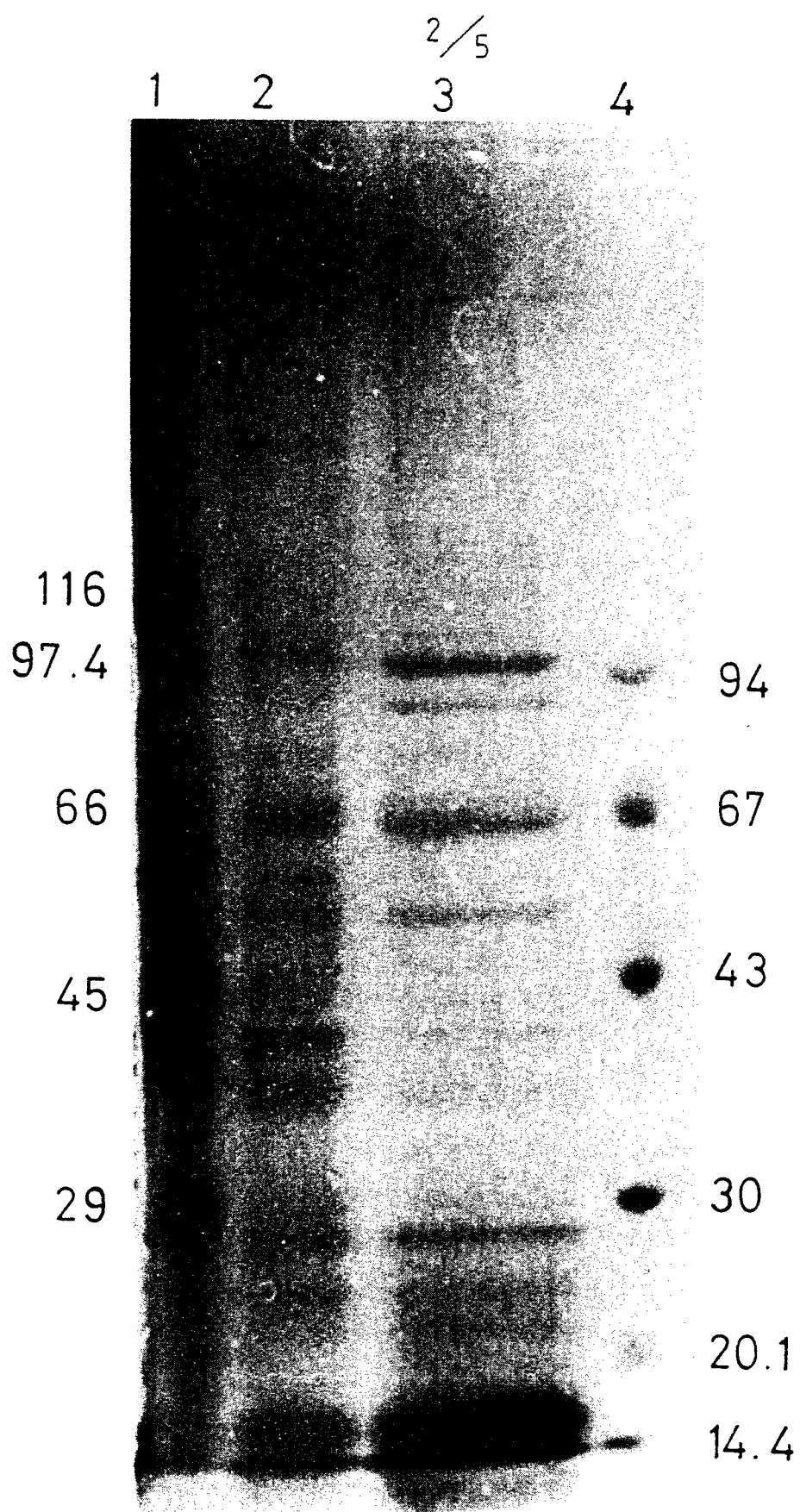


Fig. 2

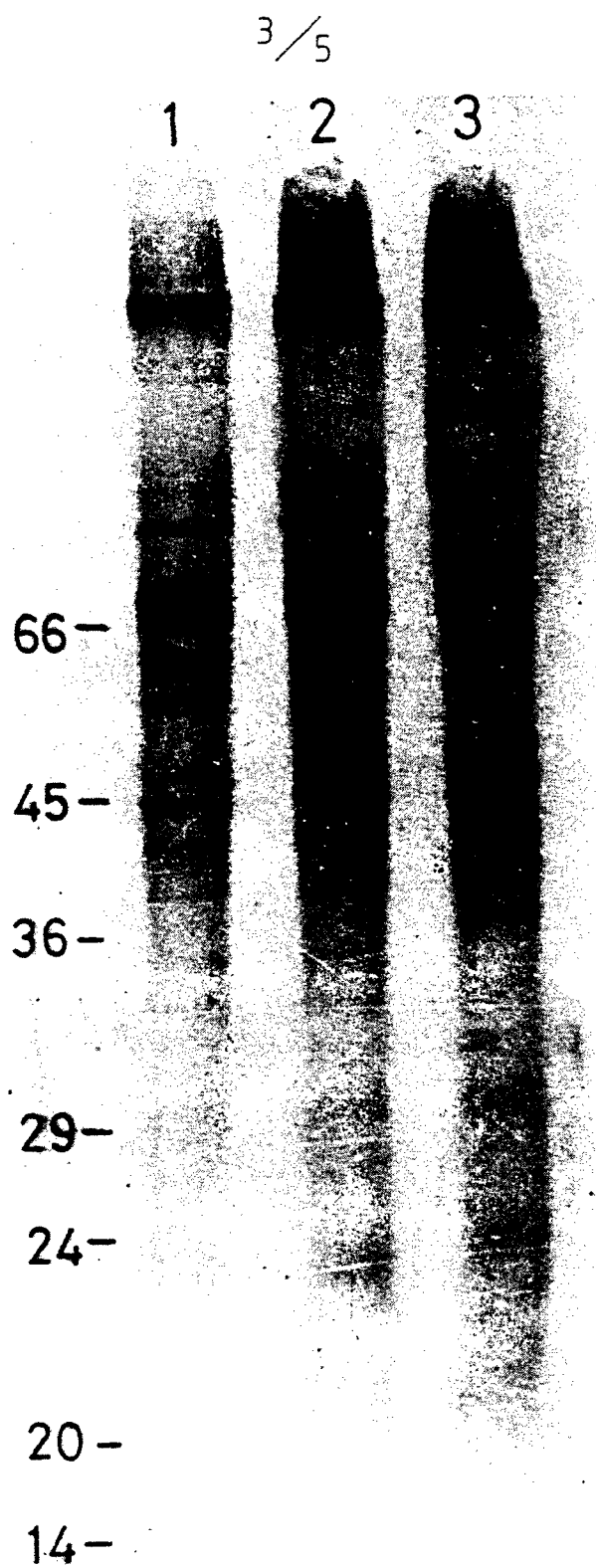


Fig. 3

4/5

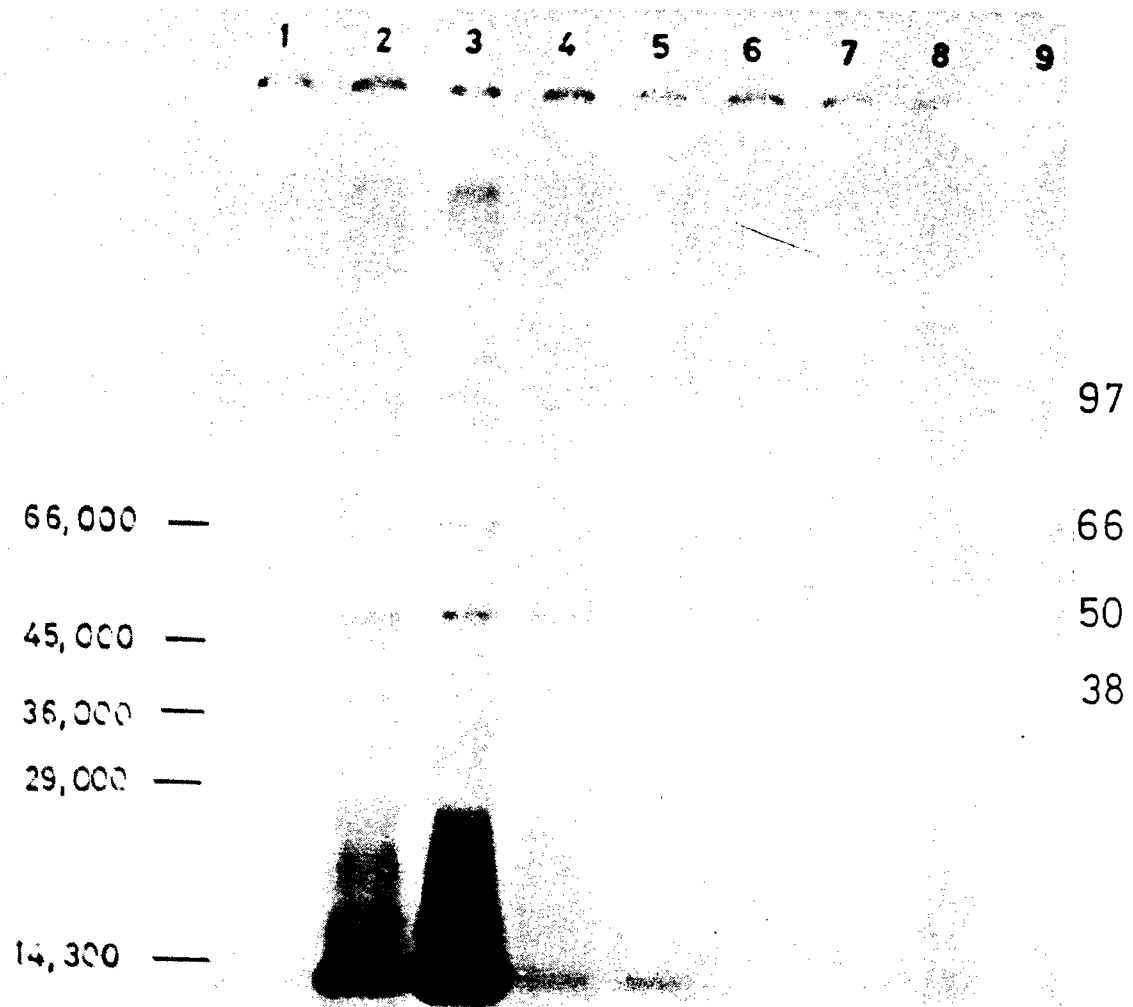


Fig. 4

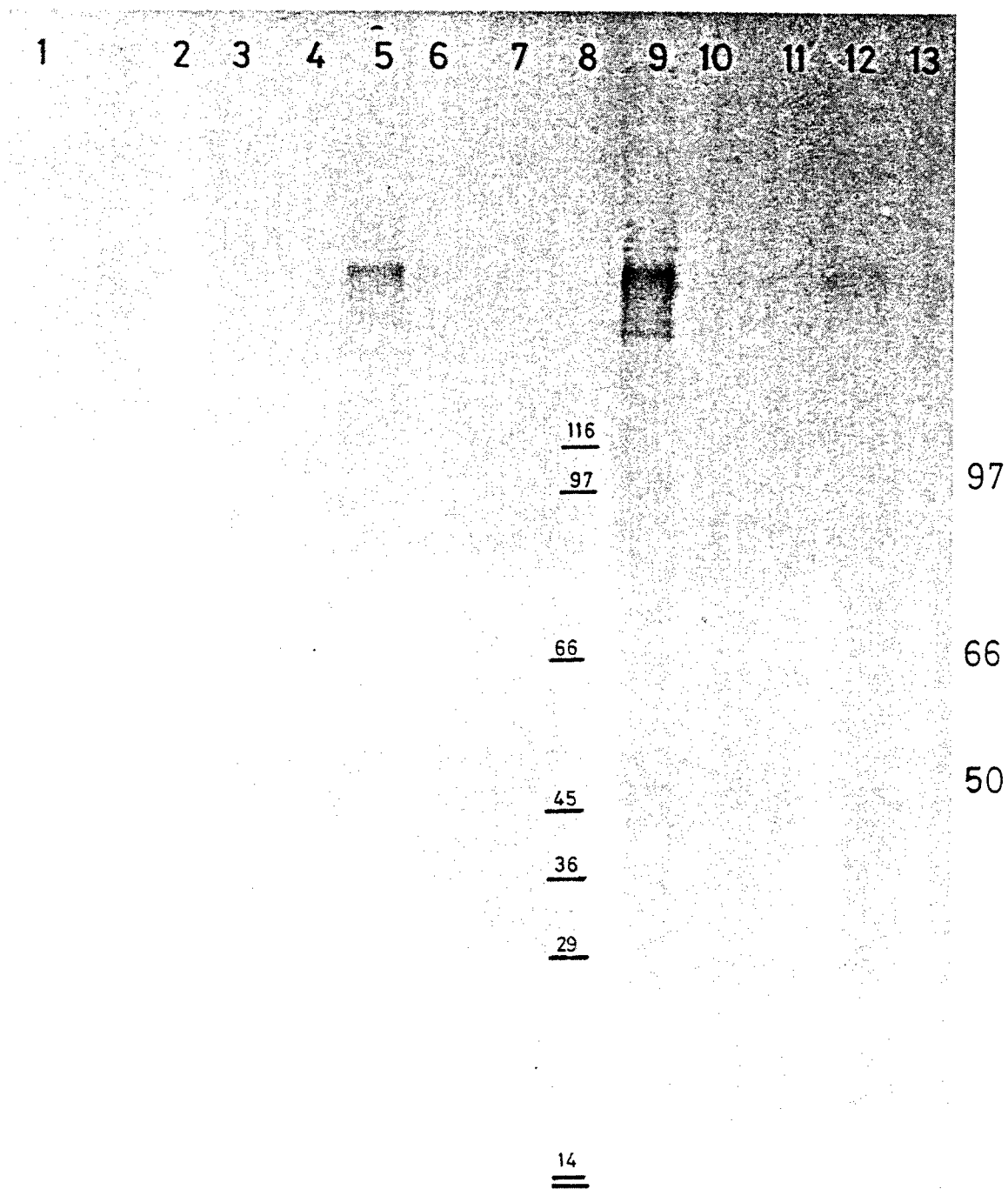


Fig. 5