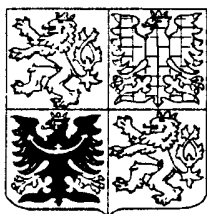


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



• ÚŘAD
PRŮMYSLÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 22.07.94
(32) 23.07.93
(31) 93/93111883
(33) EP
(40) 16.10.96

(21) 209-96

(13) A3

6(51)

C 12 N 15/38
C 12 N 15/62
C 12 N 1/21
C 12 Q 1/68
C 07 K 14/05
A 61 K 39/245
G 01 N 33/53
G 01 N 33/68

- (71) Wolf Hans Joachim, Starnberg, DE;
- (72) Wolf Hans Joachim, Starnberg, DE;
Reischl Udo, Grafenau, DE;
Motz Manfred, München, DE;
- (54) Epstein-Barr virové sekvence, kodující
diagnosticky relevantní virový kapsidový
antigen, expresní klony získané polymerázovou
řetězovou reakcí a použití tohoto
rekombinantního antigenu v diagnostických
testech
- (57) Je popsána identifikace Epstein-Barr virus (EBV) kodující-
ho genu a rychlé metody pro konstrukci plasmidů účinně
exprimujících tento nebo jiné geny. EBV gen může být čiš-
těn a použit jako antigen pro diagnózu a terapii s EBV sou-
visejícími chorobami.

1811	URAD PRÁVNÍKŮ VLASTNÍ CIVILNÍ	23 1 96	005190	č.j.
------	-------------------------------------	---------	--------	------

209-96

Epstein-Barr virové sekvence, kodující diagnosticky relevantní virový kapsidový antigen, expresní klony získané polymerázovou řetězovou reakcí a použití tohoto rekombinantního antigenu v diagnostických testech

Oblast techniky

Předložený vynález se týká DNA sekvence EBV genomu, kodující s EBV-související antigen, který může být použit v metodách a diagnostických a farmaceutických prostředcích uvedených dále a metodách lokalizace a izolace alespoň části z příslušných DNA sekvencí. Dále se tento vynález týká metod a kompozic nebo kitů, pro rychlé, jednoduché, velmi citlivé a vysoce specifické stanovení protilátek řízených k tomuto s EBV-souvisejícímu antigenu. V těchto testech uvedený antigen EBV podstatně zlepšuje detekci specifické třídy protilátek v pacientově séru. Tato detekce umožňuje spolehlivé závěry jak o stavu infekce u dárce jako je preinfekce, čerstvá infekce, chronická infekce, rekonvalescence a neoplastický stav.

Oblast techniky

Infekce virem Epstein-Barrové (EBV) a jejich následky

EBV vyvolává infekční mononukleosu jako primární chorobu. Predominantně postihuje děti nebo mladé dospělé. Více než 90 % průměrné dospělé populace je infikováno EBV, který přetrvává po celou dobu života u těchto nosičů. Tento virus je produkován celoživotně do orofarynxu a šíří se orální cestou. Zatímco infekce malých dětí často vede k téměř symptomu prosté serokonverzi, infekce dospělých často působí vážné choroby s vysokou horečkou, dramatickým zvýšením počtu bílých krvinek, bolestivý jícen, zvětšená játra a slezinu. Šarlatová horečka,

toxoplasmosa, difterie a leukemie by měly být vyloučeny diagnostickými prostředky.

Chronické infekce.

Vzácněji vede EBV infekce k chronickým nebo chronicky fluktuacním symptomům srovnatelným s akutní primární infekcí.

Vlasová leukoplakie

U imunitně postižených pacientů může EBV způsobit vážné léze na jazyku.

Reaktivace EBV u imunologicky deprivovaných individuí

Potlačení buněčně zprostředkované imunity vede k reaktivaci EBV. Zvýšené titry protilátek jsou následkem a byly popsány škodlivé účinky mnoha možností jako je rejekce transplantátů.

X-spojený proliferativní syndrom

Určité genetické konstelace jsou odpovědné za infekci samčích sourozenců, vedoucí k fatální lymforetikulární chorobě.

Burkittův lymfom a EBV

Vývoj Burkittova lymfomu je spojen s chromosomálními uspořádáními. Ne všechny případy obsahují EBV genomy v nádorových buňkách. Nicméně alespoň v oblastech s vysokým výskytem, je 97 % těchto neoplasií spojeno s EBV a kontrola EBV infekce pravděpodobně povede ke snížení rizika vývoje

Burkittova lymfomu.

Nasofaryngeální karcinom jako možná "sekundární choroba"
spojená s EBV

Jinou chorobou, kde EBV vykazuje 100% spojení je nasofaryngeální karcinom (NPC) ("The Biology of Nasofaryngeal Carcinoma", UICC technical report series, vol.71, M.J.Simons a K. Shanmugaratnam (vyd.), International Union Against Cancer, Zeneva, str.1 (1982)). NPC nejčastěji začíná v Rosenmuellerově fosse (Recessus pharyngeus) při postnasálním prostoru. Často jsou pacienti hospitalizováni teprve po vyvinutí prvních typických metastáz v cervikálních lymfatických uzlinách.

Kontrola s EBV-související neoplasie

Jsou zde možné tři základní strategie kontroly neoplasie:

1. Včasná detekce následovaná terapií,
2. odklad nástupu choroby ideálně za průměrnou dobu života a
3. prevence.

Těchto cílů je možno dosáhnout také u mnohofaktorových chorob jako jsou mnohé neoplasie. Výskyt choroby může být redukován eliminací jednoho nebo více z podstatných faktorů, které samy nejsou nutně schopny vyvolat chorobu, nebo redukcí faktorů, které promotují manifestaci neoplastických stavů. Použití specifických od viru odvozených antigenů podle tohoto vynálezu, protilátek nebo genetických materiálů jako nástrojů pro včasnou diagnosu s virem spojených nádorů, by mohlo usnadnit eliminaci základních faktorů.

Použití s EBV-souvisejících genových produktů pro diagnosu
s EBV-souvisejících NPC

Před tím, než byly dostupné rekombinantní antigeny definovaného složení, většina běžných virově specifických testů byla založena na imunofluorescenčních testech využívajících EBV genomově pozitivní buňky s různými vlastnostmi a/nebo předchozího ošetření jako zdroje obvykle s buňkami spojených antigenů v imunofluorescenčních nebo imunoenzymatických testech. Tabulka I uvádí souhrn protilátek chorobných a virálních antigenů použitelných pro diagnostiku.

Tabulka I

Vztah EBV-vyvolaných chorob a Ig-podtřídové specifické protilátkové reakce, který může být stanoven běžnými imunofluorescenčními testy

Choroba:	VCA IgG	IgM	IgA	EA IgG	EBNA IgG	MA ¹ IgG
normální						
dospělí	+	-	-	-	+	
akutní dospělí (včas)	++	+	-	+	-	-
chronická infekce	+	+	-	+/-	+/-	+/- ²
reakti- vace	+	+	-	+	+	+
XLP ²	+	-	-	+/-	(+)	?
NPC	++	-	+	+(D)	+	++
BL	++	-	-	+(R)	+	+

VCA: virální kapsidový antigen; EA: časný antigen; EBNA: Epstein-Barr nukleární antigen; ¹stanoveno imunoprecipitací gp240/200; ²XLP jako příklad imunologicky deprivovaných hostitelů.

V současnosti používané s EBV související antigeny

nejdou rozpoznávány u všech EBV infikovaných osob vzhledem k omezením imunitní odpovědi. Dále některé s EBV související antigeny se podílejí sekvenční homologií na proteinové hladině s jinými Herpes viry. Proto je technickým problémem tohoto vynálezu poskytnout s EBV-související protein, který umožní správnější diagnózu EBV infekce. Řešení výše uvedeného technického problému se dosáhne poskytnutím provedení uvedeného v nárocích. Podle předloženého vynálezu je poskytnuta EBV-kodující sonda bez podstatné genetické variability.

Podstata vynálezu

Produkce EBV-specifických antigenů podle předloženého vynálezu

1. Výsledkem všech poznatků je jedním z objektů tohoto vynálezu zlepšení citlivosti testů pro detekci tříd protilátek a specifických protilátel ke třídě virových kapsidových antigenů a zlepšení systému, který umožňuje masové testování a lepší standardizaci.

2. Aplikace technologie rekombinantní DNA umožnila identifikaci polypeptidu důležitého pro zlepšení EBV antigenicity. Produkce by mohlo být dosaženo vhodnými hostitelskými buňkami transformovanými rekombinantními DNA molekulami a narostlými ve vhodném kultivačním systému.

3. Podle předloženého vynálezu se používají rekombinantní DNA metody, zahrnující výběr modifikovaných primerů pro polymerázovou řetězovou reakci, pro expresi genetické informace genu nebo alespoň části genu, kodujícího EBV protein 23kDa (čteno od BLLF2) ve vhodných hostitelských buňkách jako jsou bakterie (např. rod E.coli, Salmonella, Pseudomonas nebo

Bacillus), kvasinky (např. rodu Candida nebo Saccharomyces), hmyzí buňky (např. Spodoptera frugiperda SF251) a savčí buňky (např. Vero-buňky, CHO-buňky nebo lymfoblastoidní buněčná linie).

4. Dále genomické regiony kodující EBV protein 23 kDa byly identifikovány a jejich relevance pro diagnostické účely demonstrována. Proto je v předloženém vynálezu také popsána klíčová informace pro produkci těchto proteinů nebo jejich antigenních determinantů.

DNA sekvence hybridizuje k DNA sekvenci získané z jakéhokoliv zdroje, zahrnující přirozený, syntetický nebo polosyntetický zdroj, který je odvozen mutacemi, zahrnujícími nukleotidové substituce, nukleotidové delece, nukleotidové inserce a inverze nukleotidové natažení k DNA sekvenci, která koduje alespoň část proteinu vztaženého ke 23 kDa proteinu, kodovaného čtecím rámcem BLFR2 B95-8 proteinu viru Epstein-Barrové. Výhodně jsou hybridizační podmínky v rozmezí 15 až 27 °C pod teplotou tání homodimerní DNA molekuly. Předložený vynález se týká produkce EBV-specifického antigenu rekombinantní DNA technologií a jeho použití v diagnostice, profylaxi a terapii chorob spojených s EBV. Proto je objektem tohoto vynálezu identifikovat nový Epstein-Barr virový antigen, který je spojen s chorobami spojenými s virem Epstein-Barr jako je nasofaryngeální karcinom (NPC), infekční mononukleosa a Burkittův lymfom (viz legenda u tabulky I) imunologickými metodami. Dalším objektem předloženého vynálezu je lokalizace a identifikace genomických regionů EBV, například jak byly klonovány z B95-8 buněk (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) CRL1612) (Skare J. a Strominger J.L. Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of the DNA from transforming B95-8

strain of Epstein-Barr virus. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:3860(1980)), které kodují uvedené antigeny diagnosticky důležité a relevantní pro medikální účely. Toho se dosáhne použitím hybridní selekční metody kombinované s imunosrážením s pacientovým sérem (obr.1). Dalším objektem předloženého vynálezu je subklonování genomického regionu EBV, např. z existujících knihoven EBV, klonovaného z B95-8 buněk, který koduje alespoň část vhodného antigenu p23. Toho se dosáhne polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), která amplifikuje genomické DNA fragmenty bez vyžadování vhodných restričních enzymových míst štěpení na koncích čtecího rámce a inzertování takových amplifikovaných genů, obsahujících systetizované konce od primerových sekvencí po vhodných klonovacích postupech do expresních plasmidů. Je zřejmé, že stejného klonovacího postupu lze dosáhnout amplifikací požadovaného genu z jiných virových izolátů, které se mohou lišit od B95-8 kodujících sekvencí. Jiné primery mohou být nezbytné pro tento účel, selekci a produkci, které jsou známe v oboru. Výběr primerů s dalšími sekvencemi 5' ze sekvencí komplementárních ke kodujícímu regionu (5' primery) nebo 3' sekvencí komplementárních ke kodujícím regionům je možný bez nutnosti rozsáhlého subklonování pro dosažení klonů přímo z produktu polymerázové řetězové reakce, které jsou optimalizovány pro další kontrolní signály. Dalším objektem tohoto vynálezu je produkce proteinů expresí případné genetické informace ve vhodných hostitelských buňkách, jako jsou bakterie (např. rodu *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* nebo *Bacillus*), kvasinky (např. rodu *Candida* nebo *Saccharomyces*), zvířecí buňky a lidské buňky (např. vero-buňky; CHO-dhfr-buňky; v kombinaci se vhodným selekčním systémem, popřípadě plasmidem nesoucím funkční dhfr gen jakož i genetickou informaci pro EBV gen pod kontrolou vhodné regulační sekvence; nebo lymfoblastoidní buněčné linie). Proteiny produkované těmito hostitelskými

buňkami obsahují 23kDa-spřízněné antigenní determinanty (epitopy) a jsou, v závislosti na expresním systému, syntetizovány buď jako fuzní protein nebo nefuzní protein. Pro produkci fuzního proteinu bakteriemi byla exprese genomických subfragmentů, kodujících p23 EBV B95-8 zavedena do známého plasmidu pUC8 a indukována např.

isopropyl- β -D-thiogalakto-pyranosidem (IPTG). Příslušné expresní produkty byly identifikovány imunologickými metodami. Pro produkci nefuzních proteinů, které v podstatě obsahují aminokyselinové sekvence přirozeně se vyskytujících proteinů nebo jejich částí mohou být rekombinantní plasmidy podle předloženého vynálezu modifikovány. Jestliže je oligonukleotidový linker inzertován mezi bakteriální protein, kodující region a EBV-související protein, kodující region expresního vektoru, stává se aminokyselinová sekvence, odpovídající oligonukleotidovému linkeru částí exprimovaného fuzního proteinu. Po izolaci tohoto fuzního proteinu z transformantů, které jej exprimují, je tento štěpen buď proteázy specifickými pro aminokyselinové sekvence v zavdeném aminokyselinovém linkeru nebo, jestliže aminokyselinový linker obsahuje peptidové vazby citlivé ke kyselému štěpení, zpracováním s kyselinami, např. kyselinou mravenčí.

Dalším objektem předloženého vynálezu je využití s EBV-souvisejícího proteinu 23 kDa nebo jeho subregionů nebo, je-li to vhodné, s EBV-souvisejících DNA fragmentů nebo klonů, pro produkci diagnostických kompozic (kitů) vhodných v klinické diagnóze nebo vědeckém výzkumu. Tyto testy jsou založeny na známých principech jako je ELISA, RIA (Radio immunoassay) nebo nepřímé hemaglutinační zkoušce. Dále s EBV-související protein může být použit např. pro sledování vakcinačních programů, analýzu epidemiologických problémů, pro

léčení pacienta (složka) medikace) a pro produkci vakcin jako míra profylaxe v terapii EBV-souvisejících chorob, jako je mononukleosa, Burkittův lymfom a nasofaryngeální karcinom. Konečně je protein vhodný pro profylaxi a terapii s EBV-souvisejících chorob, protože je schopen modulovat imunitní odezvu u pacientů postižených chorobami jako je NPC, chronická infekční mononukleosa nebo s EBV-související Burkittův lymfom.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr.1: Autoradiografie in vitro translačních produktů z RNA hybridu vybraného s BamHI DNA fragment EBV genomu.

Pro imunoprecipitaci byl použit pool EBV-specifického séra od pacientů postižených NPC. Imunoprecipitované ^{35}S -značené proteiny byly separovány SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a rentgenový film byl vystaven gelu. Kontrola, označená ("pool") obsahuje všechny z imunodetektovatelných EBV-specifických proteinů. Z autoradiografie je možno konstatovat, že protilátky ke 23kDa jsou přítomny v EBV-pozitivním séru. Je také zřejmé, že RNA z forbolesterem indukovaných P3HR1 buněk byla hybridizována proti BamHI restriční fragmentům EBV DNA, eluována a translatována in vitro. Translační produkty byly imunoprecipitovány s poolom EBV reaktivního séra předadsorbovaného s EBV genomově negativními BJAB buňkami jak bylo již popsáno (Seibl R. a Wolf H., Mapping of Epstein-Barr virus proteins on the genome by translation of hybrid-selected RNA from induced P3HR1 cells and induced Raji cells. Virology 141:1-13 (1985)).

Obr. 2 Jemné mapování mRNA souvisejících s EBV B95-8 genomem
BamHI restriční místa EBV B95-8 genomu jsou uvedena na spodku obrázku a příslušné restriční fragmenty jsou označeny

nahoře většími a menšími písmeny. mRNA z proteinů lokalizovaných hybrid-selekcí k jednotlivým BamHI restriční fragmentům jsou označeny čísly a čarami. Z jemného mapování je zřejmé, že protilátky ke 23kDa jsou přítomny v EBV-rekonvalescentním séru.

Obr.3 A) Lokalizace čtecích rámců v BamHI-L fragmentu

EBV-antigen o velikosti 23kDa byl mapován hybridní selekční translací. BLLF1 koduje EBV hlavní membránový antigen, BLLF2, BLRF1 a BLRF3 kodují proteiny s vypočtenými molekulovými hmotnostmi 31,11 kDa a 12 kDa. BLLF3 také mapuje v sousedním BamHI-S fragmentu, zatímco 23 kDa antigen kodující region byl nalezen pouze v BamJI-L. Proto se nejpravděpodobnějším kandidátem pro kodování 23kDa antigenu jeví být BLR2 kodující protein.

B) Prodloužení 5' a 3' konce BLRF2 s jak řetězci tak oligodeoxynukleotidovými primery použitými v PCR.

Primer 1 hybridizuje k DNA sekvencím, kodujícím N-konec 23-kDa proteinu. Komplementární sekvence začíná po druhém kodonu. Region kolem startu translace byl změněn na BspHI místo pro klonování do ATG-expressního vektoru. Tento zahrnuje změnu druhého kodonu z TCA na AGC, oba kodující serin. Oligodeoxynukleotidová sekvence proti směru od ATG start kodonu koduje BamHI restriční místo a několik málo dalších nt pro usnadnění restričního enzymového štěpení a klonování. Primer 2 hybridizuje při translačním stop 23-kDa a obsahuje HindIII místo na svém 5' konci pro inzerci do vektorů. Protože nehybridizující 5' konce primerů nejsou syntetizovány během prvního běhu PCR na komplementárním řetězci, ale v následujících bžích, kdy se nově generované PCR produkty použijí jako templát.

Obr.4 Generování amplifikované DNA a klonování

Oligodeoxynukleotidové primery uvedené v 1(B) byly syntetizovány na 8700 DNA syntezátoru (Biosearch/MILLIGEN) v 1 mol kolonách. Protože syntéza byla velmi účinná, byly primery použity bez dalšího čištění v PCR po odštěpení z kolony. Páté PCR reakce, obsahující paralelně stejné složení 100 μ l každá, byly provedeny s 0,25 % celkového primerového výtěžku, 4 ng plasmidu, obsahujícího BamHI-L fragment EBV (Skare J. a Strominger J.L Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:3860 (1980)), nukleotidy, pfr a Taq-polymerasu podle instrukcí výrobce. Reakce byla provedena v Ricomp teplotním cyklu s 50 °C zahřívací teploty po 2 min, prodloužení při 72 °C po 4 min a 1 min při 94 °C pro denaturaci. Bylo provedeno padesát cyklů, výsledná DNA byla odebrána, vysrážena ethanolem a sušena. Po resuspendování ve 200 l H₂O byla DNA štěpena s BamHI a HindIII. DNA fragmenty byly čištěny přes 1,5% agarozovou gelovou elektroforézu, izolovány a ligovány s pUR289 linearizovaným s BamIII v HindIII. Po transformaci do E.coli JM109 (Yarnish-Perron a spol. Improved M13 phage cloning vectors and host strains nucleotide sequences of M13mpl8 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119 (1985)) byly plasmidy z kolonií screenovány na 23kDa antigen, kodující fragment restrukčním enzymovým štěpením. Produkce EBV antigenu byla vizualizována IPTG indukci pozitivních klonů, PAGE proteinů a buď vybarvením Coomassie modří nebo Western bloty (obr.5). Z produkčního klonu pUR23k, byl opět izolován 23kDa kodující segment štěpením s BamHI a HindIII a inzertován do pDS (pDS23k). Ve třetím stupni byl fragment izolován BspHI a HindIII štěpením a ligován s pKK233-2 linearizovaným s NcoI a HindIII (pKK23k). Nakonec z pDS23k byl získán NlaIV/HindIII fragment se 370 bp a ligován s pUC8 linearizovaným s HindIII v rámci translační funkce z vektorových sekvencí do EBV souvisejícího

fragmentu.

Obr.5 Identifikace 23kDa expresního produktu v E.coli

Proteiny IPTG indukovaných klonů (1 mM IPTG po 3 h při 37 °C) byly analyzovány SDS-17,5 PAGE a vybarvením Coomassie modří (levý panel) nebo přes Western blot a imunovybarvením s vysoce titrovaným serovým poollem od NPC pacientů. Dráha 1: pUR289, β -Gal exprese; dráha 2: pUR23k; dráha 3: pDS23k; dráha 4: pKK23k; dráha 5: pUCN23k. β -Gal::23kDa fuzní protein v dráze 2 je větší než β Gal v dráze 1 (116 kDa), což indikuje přečtení amplifikovaného DNA fragmentu. 23kDa expresní produkt ve dráze 3 má velikost asi 24 kDa a je syntetizován ve velkém rozsahu. Nicméně autentický 23kDa expresní produkt z ATG vektoru ve dráze 4 není produkován účinně. C-koncový 23kDa antigenový fragment z pUCN23 ve dráze 5 se jeví být stabilní a produkován velmi účinně. Všechny antigeny reagují s NPC sérovým poollem, což velmi silně indikuje antigenicitu tohoto proteinu během virové infekce.

Obr.6 DNA a aminokyselinová sekvence 23kDa antigenu ze čtecího rámce BLRF2 viru Epstein-Barrové

Následující příklady ilustrují vynález.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Amplifikace 23kDa protein kodujícího regionu.

Možný kodující region pro 23kDa protein (BLRF2) na BamHI-L fragmentu EBV obsahuje 162 aminokyselin, Nejsou dostupná žádná vhodná restriční enzymová místa na 5' a 3' koncích pro přímé klonování plné délky čtecího rámce. Pro

tento účel byly syntetizovány dva oligonukleotidy komplementární k 5' a 3' koncům kodujícího regionu a použity jako primery v PCR. Každý primer obsahuje další sekvence na 5' konci pro restrikční místa použitelná v klonování amplifikované DNA (Obr.1) a několik dalších nukleotidů pro usnadnění rozřezání těmito restrikčními enzymy. Po PCR byly amplifikované DNA segmenty štěpeny s BamHI a HindIII, čištěny elektroforézou na agarosovém gelu a použity pro klonování s plasmidovými vektory. Plasmid, obsahující celý BamHI-L fragment z B95-8 izolátu EBV (Skare J. a Strominger J.L., Cloning and mapping BamHI endonuclease fragments of the DNA from transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:3860 (1980) byl použit jako templát.

Příklad 2

Expres 23kDa VCA v *E.coli* jako β -galaktosidasového fuzního proteinu

Protože mnoho rekombinantních antigenů není stabilně exprimováno jako nefuzní antigeny v *E.coli*, byla provedena první hodnocení produkci β -galaktosidasových fuzních proteinů, kde velký bakteriální protein teoreticky chrání nestabilní proteinové segmenty před degradací. Proto byla amplifikovaná DNA štěpená s BamHI a HindIII klonována v rámci 3' lacZ genu β Gal expresního vektoru pUR289 (Rüther a Müller, Easy identification of cDNA clones. EMBO J. 2(1983)1791-1794)(Obr.4.). *E.coli* klon, obsahující tento vektor byl indukován s IPTG za účelem exprese β Gal::23kDa fuzního proteinu. Obr.5 demonstruje, že byl syntetizován produkt s molekulovou hmotností vyšší než má autentický β Gal. Fuzní protein reaguje specificky se serem, obsahujícím vysoké EBV protilátkové titry. Toto indikuje, že proběhla správná translace., nebyly zavedeny žádné podstatné chyby nebo stop

kodony při PCR a že byl produkován imunogenický EBV antigen.

Příklad 3

Expres 23kDa jako autentického proteinu

Z pUR289-23k byl izolován EBV kodující region s BamHI a HindIII a klonován do pDS12/RBSII-2, který byl přejmenován na pDS3 pro tuto prezentaci (Bujard H. a spol. The T5 promotor-based transcription translation system for the analysis in vitro and in vivo. Meth.Enzymol. 155:416 (1987)), který doplňuje stejný translační rámec jak je uveden ve 23kDa kodujícím regionu (obr.4). Po indukci s ITPG se objevuje nový proteinový pruh se 23 kDa v Coomassie vybarvené PAGE. Specificky reaguje s EBV serem na Western blotech a představuje asi 10 % celkového E.coli proteinu jak může být stanoveno z Coomassie-vybarveného gelu (obr.5). Protože expresní produkt obsahuje málo aminokyselin odvozených od klonovacího místa a oligonukleotidových sekvencí, bylo exprese autentického proteinu dosaženo izolací tohoto fragmentu s BspHI a HindIII a jeho inzertováním do NcoI a HindIII míst ATG vektoru pKK233-2 (Amam E., a Brosius J., J.'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in Escherichia coli. Gene 40:183-190 (1985)). Avšak expresní výtěžek 23kDa antigenu z tohoto vektoru byl mnohem menší než z pDS vektoru, což může být způsobeno neúčinnou translací tohoto proteinu v E.coli buňkách způsobenou změněnou N-koncovou sekvencí.

Další exprese bylo dosaženo z menšího fragmentu, kodujícího C-koncovou část 23kDa antigenu. Z kodujícího regionu NlaIV/HindIII fragment byl izolován a inzertován do HindII/HindIII pUC8 (Vieira B. a Messing B. The pUC plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19

(1982)259-268) ~~z~~ účelem produkce pUCN23k. Opět byla nalezena velmi účinná produkce antigenu po ITPG indukci. Ale protože tento antigen neobsahuje N-konec autentického proteinu není použitelný pro další hodnocení.

Příklad 4

Reakce a specifita 23kDa VCA

Počáteční hodnocení diagnostické hodnoty rekombinantního antigenu bylo provedeno s EBV pozitivním a negativním sérem získaným z různých serových zdrojů, tj. pacientů s infekční mononukleosou, pacientů postižených NPC a ~~z~~travých nosičů. Surové bakteriální lyzáty, obsahující 23kDa antigen z pD23k a lyzáty s necizími antigeny jako kontroly běžely odděleně na PAGE. Proteiny byly přeneseny na nitrocelulózové filtry a jejich pásy byly inkubovány se sérem. Výsledky imunovybarvených Western blot pásů jsou shrnuty v tabulce II. Při porovnání s běžnými imunofluorescenčními testy VCA pozitivního séra od zdravých nosičů a NPC pacientů byly jasné pozitivní pro 23kDa antigen. Pouze dvě séra reaktivní v IF testu nevykazují žádnou reakci. Tři séra od čerstvě infikovaných osob, stanovená z IF, také nevykazují žádnou reakci a tři sera považovaná za EBV negativní byla nalezena jako pozitivní s p23kDa antigenem. Souhrnně, je možno vidět širokou korelaci IF a Western blot aktivity. Nicméně je nezbytné další testování pro zkoušení relevance a citlivosti tohoto antigenu ve srovnání s IF testy.

Tabulka II

Reaktivita 23kDa antigenu s různými séry ve srovnání s IF
výsledky

IF-reaktivita	EBV status ^a	č. testovaného séra	reaktivita s s rekombinant- ním 23k antigenem ^b	
			poz.	neg.
VCA+EBNA+	zdravý nosič	34	32	2
VCA+EBNA+	NPC pacient	4	4	0
VCA+EBNA-	čerstvá inf.	9	6	3
VCA-EBNA-	EBV negativní	6	3	3

^aEBV status byl stanoven rutinními diagnostikami s IF reaktivitou a dalšími klinickými údaji.

^bReaktivita 23kDa antigenu byla stanovena Western blot analýzou.

Klasifikace séra podle IF testů byla: VCA+, EBNA+ = zdravý nosič; VCA+, EBNA+ klinické údaje = NPC; VCA+, EBNA-, klinické údaje = čerstvá infekce; VCA-, EBNA- = negativní pro EBV.

PATENTOVÉ NÁROKY

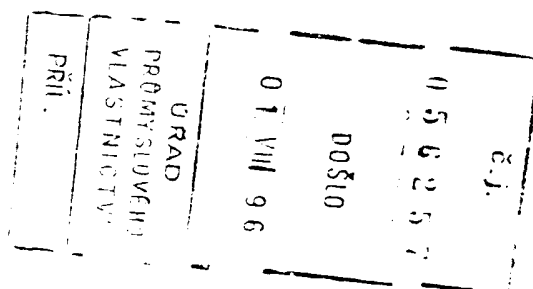
1. DNA sekvence EBV-genomu, vyznačující se tím, že odpovídá s EBV-souvisejícímu antigennímu proteinu, majícímu aminokyselinovou sekvenci jak je uvedena na obr. 6.

2. DNA sekvence podle nároku 1, vyznačující se tím, že koduje s EBV-související antigenní protein o molekulové hmotnosti 23 kDa.

3. DNA sekvence hybridizující k DNA sekvenci podle nároku 1 nebo 2, z jakéhokoliv získaného zdroje, zahrnujícího přírodní, syntetické nebo polosyntetické zdroje, která je příbuzná mutacemi, zahrnujícími nukleotidové substituce, nukleotidové delece, nukleotidové inserce a inverze nukleotidových pásů s DNA sekvencí podle nároku 1 a která koduje protein, mající antigenní vlastnosti uvedeného 23 kDa EBV proteinu.

4. DNA sekvence podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že je inzertována do rekombinantního plasmidu pUR289-23k, pDS-23k, pUC8-N23, kde konstrukce uvedených plasmidů je uvedena na obr.4.

5. DNA sekvence podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že obsahuje na svém 5' konci oligonukleotid kodující oligopeptid, který slouží ve výsledném štěpící místo pro sekvenčně specifickou proteázu nebo který je štěpitelný zpracováním s kyselinou jako je kyselina mravenčí nebo který usnadňuje následné čištění.



6. Rekombinantní DNA molekula pro klonování, vyznačující se tím, že obsahuje DNA sekvenci podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5.

7. Rekombinantní DNA molekula pro expresi, vyznačující se tím, že obsahuje DNA sekvenci podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, která je operativně napojena k expresní kontrolní sekvenci.

8. Rekombinantní DNA molekula podle nároku 7, vyznačující se tím, že expresní kontrolní sekvence je E.coli lambda-promotorový systém, E.coli lac-systém, E.coli β -laktamázový systém, E.coli trp-systém, E.coli lipoproteinový promotorový systém, kvasinková expresní kontrolní sekvence nebo jiná eukaryotická expresní kontrolní sekvence.

9. Hostitel, vyznačující se tím, že je transformován alespoň jednou rekombinantní DNA molekulou podle kteréhokoliv z nároků 6 až 8.

10. Hostitel podle nároku 9, kterým je kmen E.coli, jiná bakterie, jiná kvasinka, jiná houba, živočišná nebo lidská buňka.

11. Protein, mající s EBV-související antigenní determinanty vhodné pro diagnózu a terapii s EBV-spojených chorob, vyznačující se tím, že je kódován DNA sekvencí podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5.

12. Fuzní protein, vyznačující se tím, že obsahuje protein podle nároku 11.

13. Nefuzní protein, vyznačující se tím, že obsahuje protein podle nároku 11.

14. Způsob produkce proteinu podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13, vyznačující se tím, že zahrnuje kultivaci hostitele podle nároku 9 nebo 10 za vhodných podmínek v médiu, akumulaci proteinu v kultuře a jeho získání z ní.

15. Diagnostická kompozice pro detekci anti-EBV-protilátek, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden protein podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13 v množství dostačujícím k navázání uvedených anti-EBV-protilátek ve vzorku.

16. Způsob konstrukce klonovatelné a/nebo exprimovatelné DNA sekvence, zahrnující stupně anelace vhodných oligonukleotidových primerů k DNA sekvenci podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5 a provedení polymerázové řetězové reakce (PCR), vyznačující se tím, že primery obsahují na svém 5'- a 3'-konci, další nehomologní sekvence, které představují klonovací a/nebo expresní kontrolní sekvence.

17. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že expresní kontrolní sekvence obsahuje transkripční a/nebo translační začátek a/nebo zvětšené místo a signály pro ukončení transkripce a/nebo translace nebo sekvence důležité pro zpracování kódovaného transkriptu.

18. Kit, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden protein podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13.

19. Farmaceutický přípravek, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden protein podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13 a farmaceuticky přijatelný nosič.

20. Vakcína, vyznačující se tím, že obsahuje protein podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13.

21. Použití proteinu podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13 pro přípravu farmaceutického přípravku pro profylaxi nebo terapii s EBV-souvisejících chorob, kde uvedenou s EBV-související chorobou je NPC, chronická infekční mononukleosa nebo s EBV-související Burkittův lymfom, Hodgkinova choroba, nasofaryngeální karcinom, EBV reaktivace v souvislosti s transplantací orgánu.

22. Způsob specifické detekce EBV infekcí, vyznačující se tím, že používá celé nebo fragmenty DNA sekvence podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5 pro detekci EBV DNA v klinických vzorcích při hybridizaci s nebo bez další amplifikace.

23. Primerový pár, který hybridizuje k 5' a 3' koncům kodující oblasti DNA sekvence podle nároku 1 nebo 2 a jeho komplementární řetězce.

Zastupuje :

Dr. Miloš Všetečka

(1) Obecná informace:

(A) jméno: Wolf, Hans Joachim
(B) ulice: Josef-Jaegerhuber-Strasse 9
(C) město: Starnberg
(E) země: DE
(F) poštovní kód (ZIP): 82319

(A) jméno: Reischl Udo
(B) ulice: Grosse Leite 7
(C) město: Grafenau
(E) země: DE
(F) poštovní kód (ZIP): 94481

(A) jméno: Motz Manfred
(B) ulice: Schachnerstrasse 7
(C) město: Mnichov
(E) země: DE
(F) poštovní kód (ZIP): 81379

005790
23196
005790
23196
005790
23196

(ii) Název vynálezu: Epstein-Barr virové sekvence, kodující diagnosticky relevantní virový kapsidový antigen, expresní klony získané polymerázovou řetězovou reakcí a použití tohoto rekombinantního antigenu v ...

(iii) počet sekvencí: 2

(iv) počítačově čitelná forma:

(A) typ media: floppy disk
(B) počítač: IBM PC kompatibilní
(C) operační systém: PC-DOS/MS-DOS
(software): PatentIn Release č.1,0, version č. 1,25

(EPO)

(V) údaje o přihlášce:

číslo přihlášky: PCT/E/94/02439

(vi) prioritní údaje o přihlášce:

(A) číslo přihlášky: EP 93 11 1883.0
(B) datum podání: 23.7.1993

(2) informace o sekvenci ID NO:1

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 489 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězec: jeden
(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(ix) : rysy:

(A) jméno/klíč: CDS
(B) lokace: 1..486

(xi) popis sekvence

SEQ ID NO: 1:

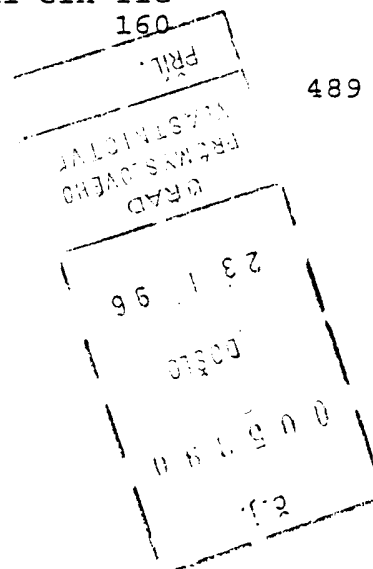
ATG	TCA	GCT	CCA	CGC	AAA	GTC	AGA	TTG	CCT	TCT	GTT	AAG	GCT	GTT	GAC	48
Met	Ser	Ala	Pro	Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Val	Lys	Ala	Val	Asp	
1				5					10					15		
ATG	AGC	ATG	GAA	GAC	ATG	GCC	GCC	CGC	CTG	GCT	CGC	CTG	GAG	TCT	GAG	96
Met	Ser	Met	Glu	Asp	Met	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu	Ser	Glu	
			20					25					30			
AAT	AAG	GCT	CTG	AAG	CAA	CAG	GTC	CTC	AGA	GGG	GGT	GCC	TGT	GCC	TCG	144
Asn	Lys	Ala	Leu	Lys	Gln	Gln	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Ser	
		35					40					45				
TCT	ACC	TCT	GTT	CCT	TCT	GCT	CCA	GTG	CCT	CCG	CCT	GAG	CCG	CTT	ACA	192
Ser	Thr	Ser	Val	Pro	Ser	Ala	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Leu	Thr	
	50					55					60					
AT	CGA	CAG	CGA	GAG	GTA	ATG	ATT	ACG	CAG	GCC	ACG	GGC	CGT	TTG	GCG	240
Ala	Arg	Gln	Arg	Glu	Val	Met	Ile	Thr	Gln	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ala	
65					70					75					80	
TCT	CAG	GCT	ATG	AAG	AAG	ATT	GAA	GAC	AAG	GTT	CGG	AAA	TCT	GTT	GAC	288
Ser	Gln	Ala	Met	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Lys	Val	Arg	Lys	Ser	Val	Asp	
				85					90					95		
GGT	GTA	ACT	ACC	CGC	AAT	GAA	ATG	GAA	AAT	ATA	TTG	CAA	AAT	CTG	ACC	336
Gly	Val	Thr	Thr	Arg	Asn	Glu	Met	Glu	Asn	Ile	Leu	Gln	Asn	Leu	Thr	
			100					105					110			
CTC	CGC	ATT	CAA	GTA	TCT	ATG	TTG	GGT	GCA	AAA	GGC	CAA	CCC	AGC	CCT	384
Leu	Arg	Ile	Gln	Val	Ser	Met	Leu	Gly	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Pro	
		115					120					125				
GGT	GAG	GGA	ACA	CGA	CCA	CGA	GAA	TCA	AAC	GAC	CCC	AAC	GCC	ACC	CGA	432
Gly	Glu	Gly	Thr	Arg	Pro	Arg	Glu	Ser	Asn	Asp	Pro	Asn	Ala	Thr	Arg	
	130					135					140					
CGT	GCC	CGC	TCC	CGC	TCC	CGG	GGA	CGT	GAA	GCA	AAG	AAA	GTG	CAA	ATT	480
Arg	Ala	Arg	Ser	Arg	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Ala	Lys	Lys	Val	Gln	Ile	
145					150					155					160	
TCT	GAT	TAA														489
Ser	Asp															

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

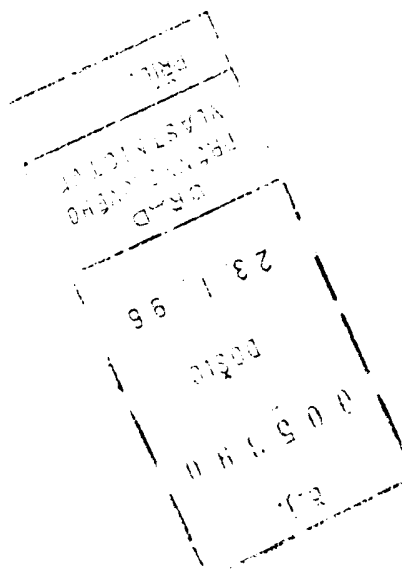
(i) charakteristiky sekvence SEQ ID NO:2:

- (A) délka: 162 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein



(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

[illegible]

0 0 5 3 8 0
DOJIO
2 3 1 9 6
URAD
FROMYEVENHO
VIASINICTV
PRIL. -

1/11

delkem

C

W

Y

H

150
143
138

110

▲▲▲▲ 92
▲▲▲▲ 90
▲▲▲▲ 84
▲▲▲▲ 80

49
48
47
44

◀ 40
◀ 39
◀ 35
◀ 33
◀ 31

◀ 23

▶ 19
▶ 18

143

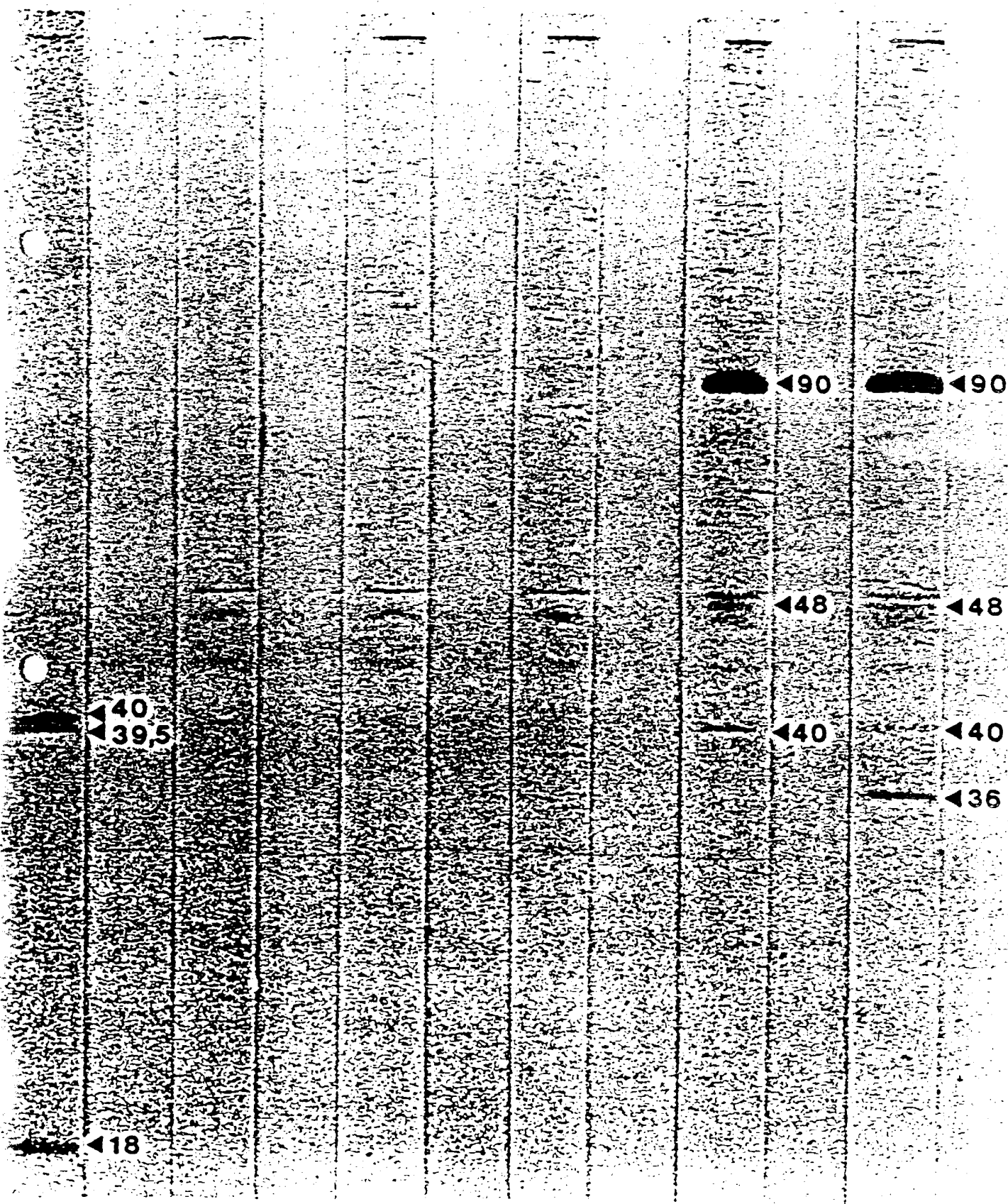
18

Ohr. 1 B

2/11

2.1.	0 0 5 3 9 0	00510	2 3 1 9 6
GRAND	PROBAC OV 100	ELASTICITÄT	FRI.

F Q U P O a



Obr. 1 C

3/11

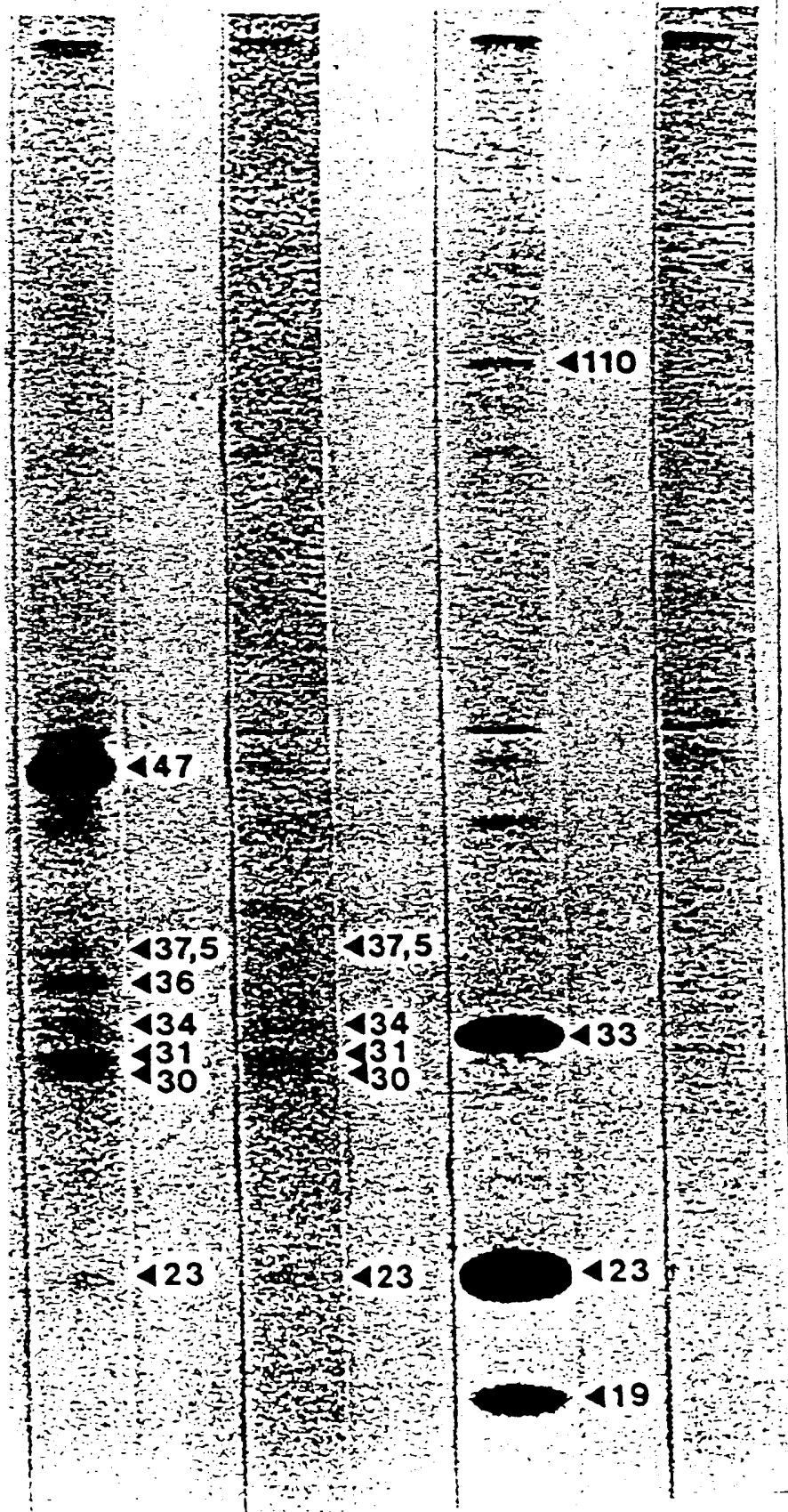
č.j.	005390
00510	
23 1 96	
URAD	
PRŮMYŠLOVÉ	
MAŠTICITVÉ	
PŘÍL.	

M

S

L

E



RNA

Obr. 1 D

4/11

č.j.	005390
Došlo	23. 1. 96
ORAN	
PRŮMYSLOVÉHO VLAŠTIVOSTI	
PRŮM.	

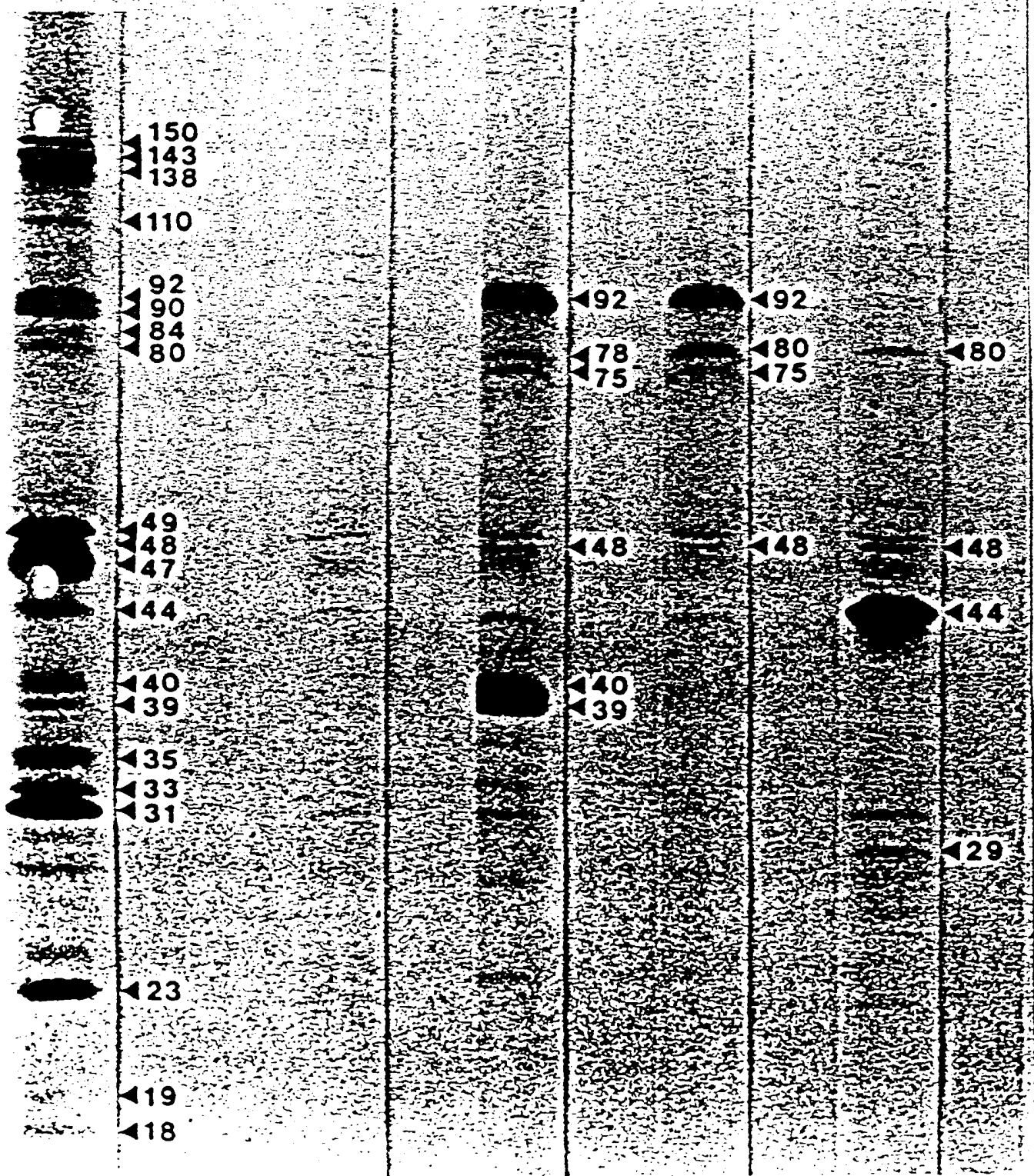
celková

e

Z

R

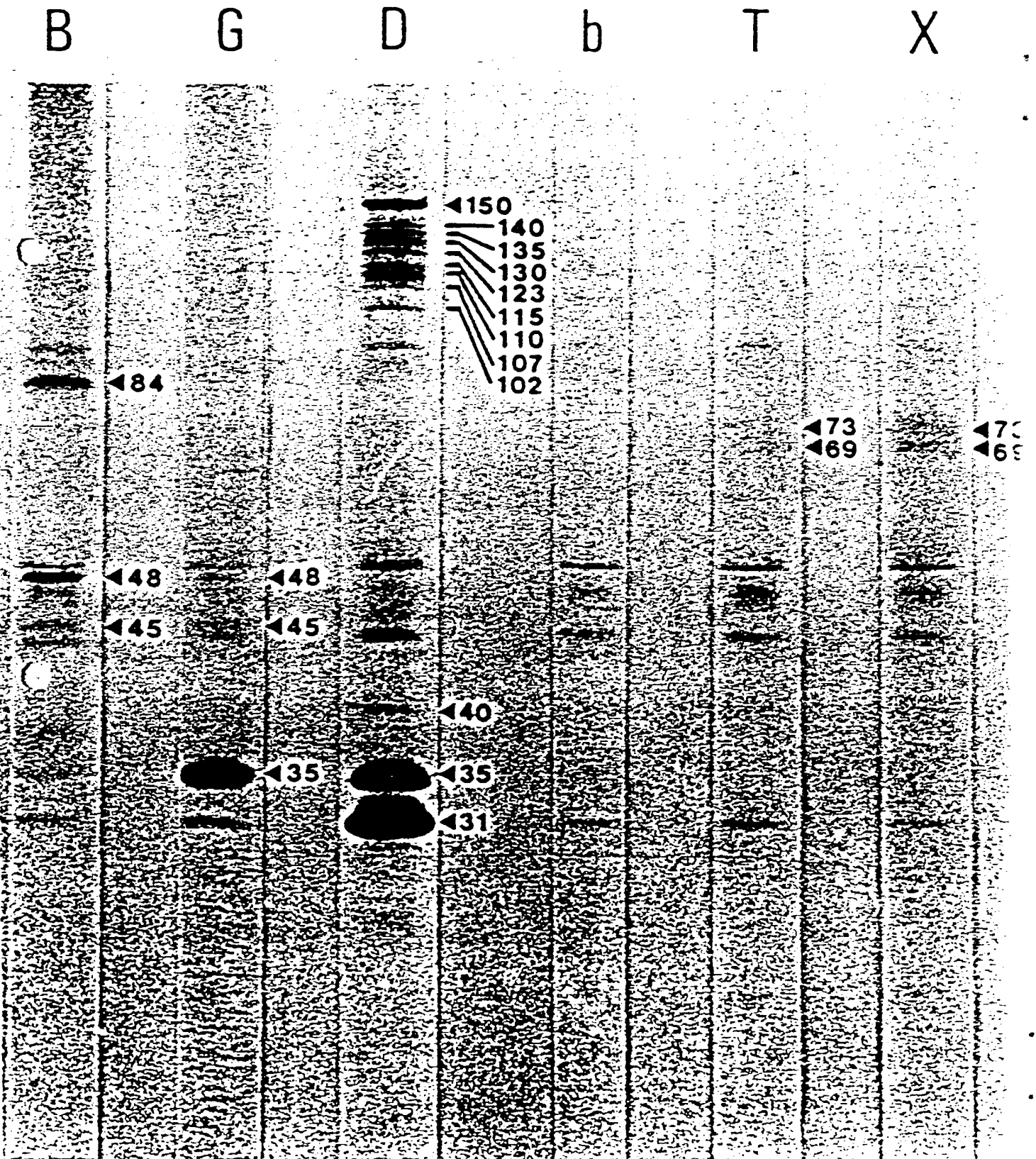
K



Ohr 1 E

5/11

PRIL	URAD	FRAMES OVER	VLASTNICI	23 1 96	005390	005390	005390
------	------	-------------	-----------	---------	--------	--------	--------



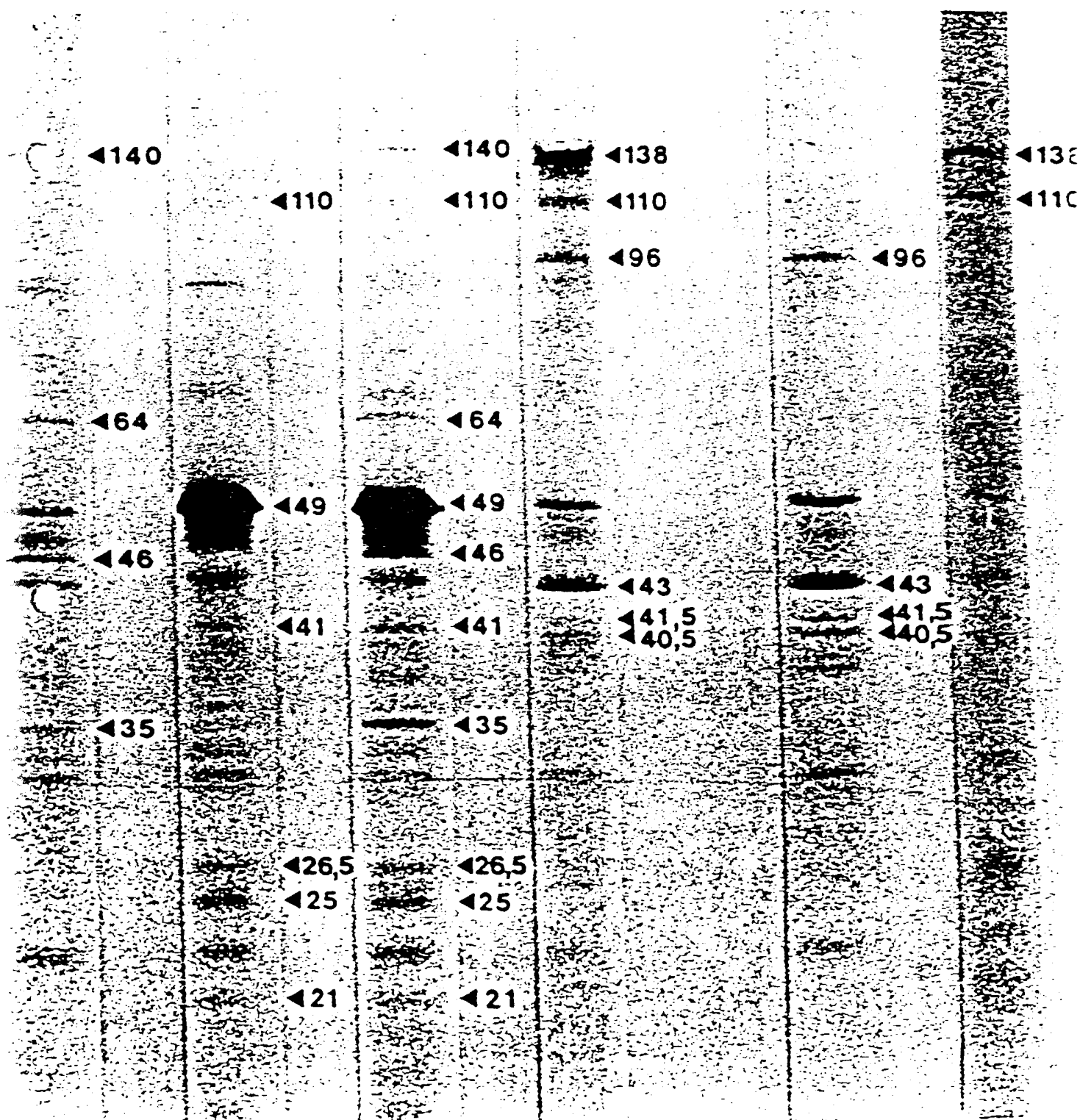
Obr. 1F

6/11

005190	005190	005190
DOŠLO	DOŠLO	DOŠLO
23 1 96	23 1 96	23 1 96
FRH	FRH	FRH
FRANJELOVIĆ	FRANJELOVIĆ	FRANJELOVIĆ
VIŠINJIC	VIŠINJIC	VIŠINJIC
FRH	FRH	FRH

V d l A

M3-1-1
M3-5-6



Chr.

2

protein v indukovaných RAJI buňkách

47
41
40
39.5
35

96

90

18

47

48

105

7/11

protein v indukovaných P3HR1 buňkách

37.5
34
31
30

23

80

150

140

135

130

123

115

110

107

102

40

31

48

45

140

64

46

35

140

64

46

35

140

96

43

41.5

40.5

138

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

110

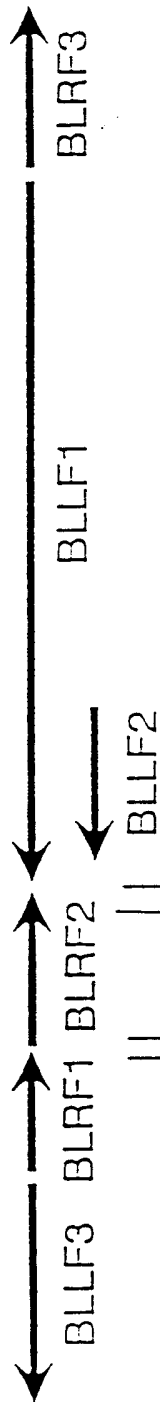
110

110

1000 bp

Obr. 3

A



B

5' —ATGTCAGCTCCACGCAAGTCAGATTGCCT—
3' —TACAGTCGAGGTGCGTTTCAGTCTAACGGA—

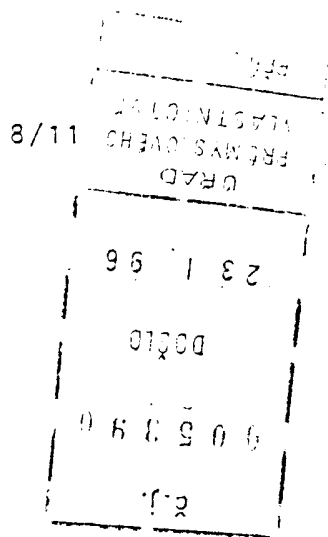
GCTCCACGCAAGTCAGATTGCCT 3'

Primer 1

Primer 2

3' CGTTTCTTTCACGTTTAAAGACTAATTATTT
GCAAAGAAAGTGCAAATTTCTGATTATAAATTT
CGTTTCTTTCACGTTTAAAGACTAATTATTTAAA

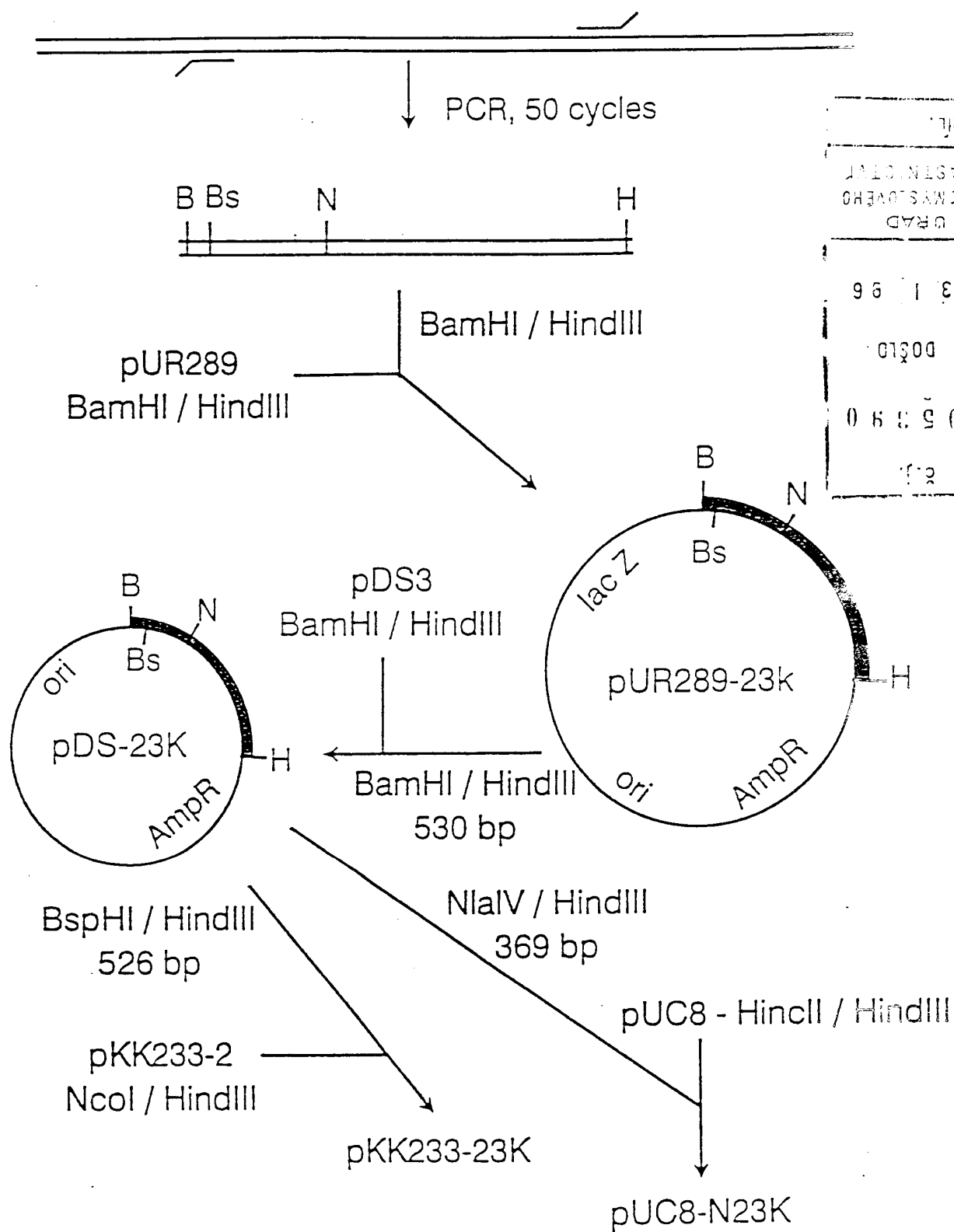
5'



CGAAGAC 5'

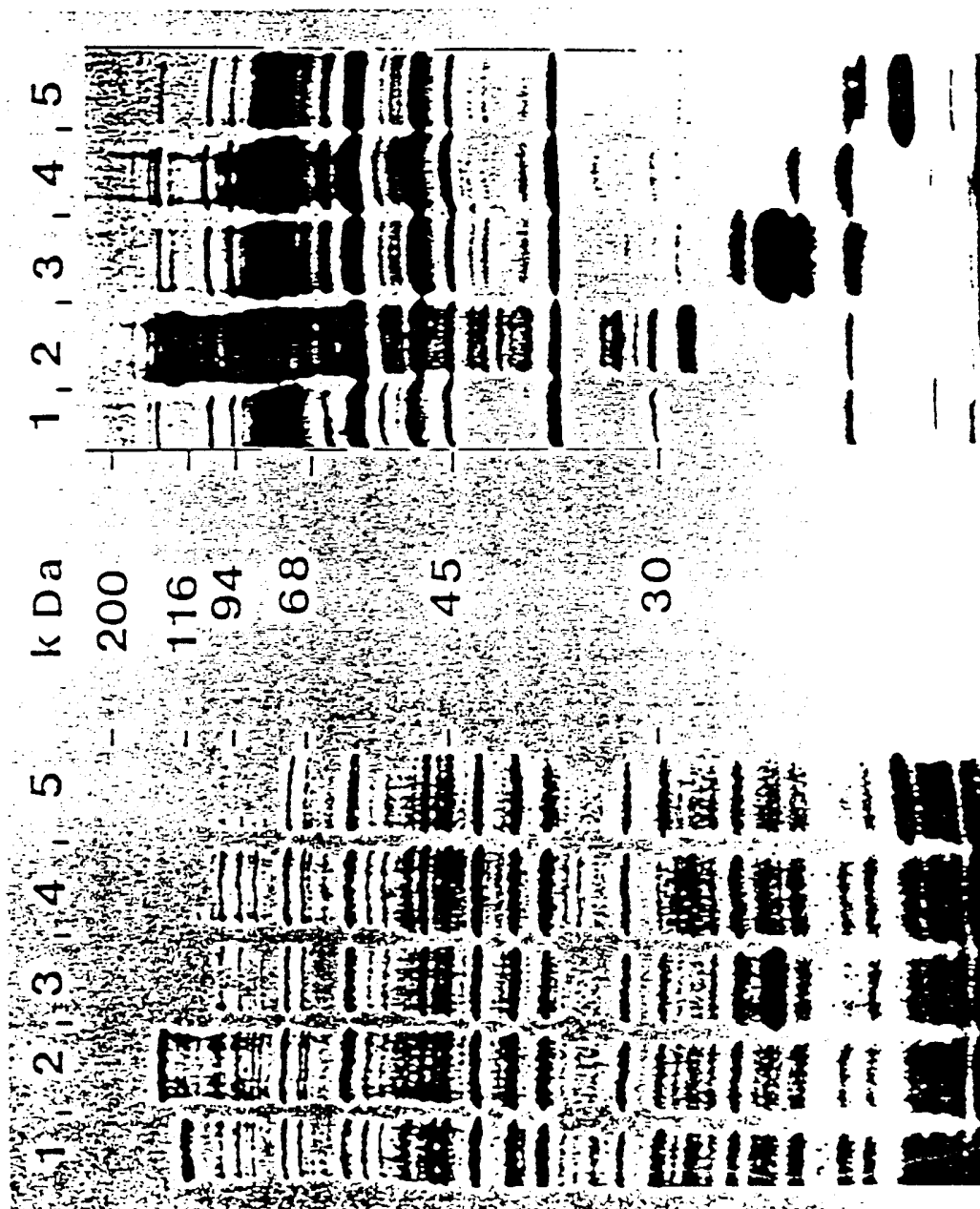
Obf. 4

9/11



Obr. 5

10/11



Obr. 6

11/11

U RAD
PRIMARS OVCH
VLASTNICI V
PRIL.
23.1.96
005390
00310

ATGTCAGCTCCACGCAAGTCAGATTGCCTTCTGTTAAGGCTGTTGACATGAGCATGGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
MetSerAlaProArgLysValArgLeuProSerValLysAlaValAspMetSerMetGlu

GACATGGCCCGCCCGCTGGCTCGCCTGGAGTCTGAGAATAAGGCTCTGAAGCAACAGGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AspMetAlaAlaArgLeuAlaArgLeuGluSerGluAsnLysAlaLeuLysGlnGlnVal

CTCAGAGGGGGTGCCTGTGCCTCGTCTACCTCTGTTCCCTTCTGCTCCAGTGCCTCCGCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
LeuArgGlyGlyAlaCysAlaSerSerThrSerValProSerAlaProValProProPro

GAGCCGCTTACAGCTCGACAGCGAGAGGTAATGATTACGCAGGCCACGGGCGGTTTGGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GluProLeuThrAlaArgGlnArgGluValMetIleThrGlnAlaThrGlyArgLeuAla

TCTCAGGCTATGAASAAGATTGAAGACAAGGTTCCGGAATCTGTTGACGGTGTAAGTACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
SerGlnAlaMetLysLysIleGluAspLysValArgLysSerValAspGlyValThrThr

CGCAATGAAATGGAAAATATATTGCAAAATCTGACCCTCCGCATTCAAGTATCTATGTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ArgAsnGluMetGluAsnIleLeuGlnAsnLeuThrLeuArgIleGlnValSerMetLeu

GGTGCAAAAGGCCAACCCAGCCCTGGTGAGGGAACACGACCACGAGAATCAAACGACCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GlyAlaLysGlyGlnProSerProGlyGluGlyThrArgProArgGluSerAsnAspPro

AACGCCACCCGACGTGCCCGCTCCCGCTCCCGGGGACGTGAAGCAAAGAAAGTGCAAAATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AsnAlaThrArgArgAlaArgSerArgSerArgGlyArgGluAlaLysLysValGlnIle

TCTGATTAA

SerAspEnd