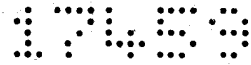


1472/90

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



NSO, G 01 N 33/569
A 61K 39/002
C 12P 21/00

54.310/BE

56971-2

K I V O N A T

Új immunodiagnosztikai módszer

Aktiebolaget ASTRA, Södertälje, Svédország

A bejelentés napja: 1990. 01. 16.

Elsőbbsége: 1989. 01. 24. (89 00243-0) Svédország

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/SE90/00034

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/08958

A találmány a neurocysticercosis diagnózisára szolgáló egy új immundiagnosztikai eljárásra vonatkozik.

Az eljárás a *Cysticercus cellulosae*-val fertőzött beteg cerebrospinális folyadékában vagy szérumában jelenlévő antitest vagy antigén kimutatását teszi lehetővé. A találmány az előllított proteineknek vakcina készítésre való felhasználhatóságát is tárgyalja.

jellemező ábra művés

And

1472/90

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

56971-9 A⁴

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

54.310/BE

NSO ✓

G OIN 33/569

A 61K 39/002

C 127 21/00

Új immunodiagnosztikai módszer

Aktiebolaget Astra, Södertälje, Svédország

Feltalálók: RAVI KUMAR B. V., Bangalore,

SURYANARAYANA V., Bangalore,

RAVI V., Madras,

CHANDRAMUKHI A., Bangalore,

India

A bejelentés napja: 1990. 01. 16.

Elsőbbsége: 1989. 01. 24. (89 00243-0) Svédország

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/SE90/00034

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/08958

A *Cysticercus cellulosae* (sertés borsóka) a *Taenia solium*, azaz a horgasfejű galandféreg lárva formája, megfertőzheti az emberi agyat súlyos neurológiai tünetcsoportokat okozva, amelyeket gyűjtőnéven neurocysticercosis-nak (NCC) neveznek.

A borsóka koponyán belüli elhelyezkedésétől függően gyakran láthatók a következő klinikai képek:

Elhelyezkedés	Klinikai szindróma	Következmény
Agyszövet	Epilepszia	Motoros vagy
	Tér-szűkítő lézió (space occupying lesion = SOL)	szenzoros hiány
	Pszichózis	
	Encephalitis	
Agyhártya	Krónikus meningitis	Vízfejűség
		Koponya-ideg bénulások
		Motoros vagy szenzoros hiány
Agykamra	SOL	Vízfejűség

A fent leírt klinikai szindrómákat több etiológiai (kóroktani) faktor okozhatja. A neurocysticercosis legáltalánosabb differenciáldiagnózisát az idegrendszer Mycobacterium tuberculosis fertőzéseitől való elkülönítés képezi. A betegség diagnózisa a koponya radiológiai vizsgálatán alapult. A koponya röntgenfelvételekor az elhalt elmeszesedett borsókák mint tömör, sugár-átnemeresztő léziók jelennek meg, míg az élő borsókák mint kevésbé tömör vagy erősen tömör léziók jelennek meg a komputer-tomogrammon (komputerizált-rétegfelvétel; CAT-SCAN). Legújabbban a központi idegrendszer (CSN= central nervous system) mágneses rezonancia leképezését alkalmazzák az élő borsókák láthatóvá tételére. A borsókák azonosítására ezek közül bármelyik leképező eljárás alkalmazása nagyban függ a borsókák méretétől és a környező gazdaszövet reakciójától. Sok fejlődő országban, ahol ez elterjedt betegség, ezekhez a leképező berendezésekhez

nem könnyű hozzájutni, ami azt jelenti, hogy égetően szükség van egy más, egyszerű diagnosztikai módszerre. Tehát van igény egy olyan immundiagnosztikai tesztre, amellyel el lehet különíteni a neurocysticercosist más neurológiai betegségektől. A meglévő immunológiai vizsgálatok többsége arra irányul, hogy az azonosítandó szervezet antigénjeivel szembeni antitesteket kimutassa. Ezenkívül számos vizsgáló módszert fejlesztettek ki, amelyeket mint szero-diagnosztikai tesztek, epidemiológiai (járványtani) felmérésekre használnak, de ezeket a tesztek nem a neurocysticercosis nagyon specidális diagnózisa céljára fejlesztették ki.

A módszer specificitása és érzékenysége nagyban függ a tesztben használt antigéntől. A találmány eljárást ír le olyan *Cysticercus cellulosae* antigének előállítására, amelyek az immundiagnózis specificitását és érzékenységét biztosítják. Antigén előállítás és immundiagnózis a tudomány mai állása szerint

A *T. solium* lárva nyers kivonatait úgy állították elő, hogy (1) vagy a borsóka teljes homogenizátumát készítették el, vagy (2) a borsóka szilárd részeiből, azaz a borsóka falából és a scolex-ből (galandféreg fej) vagy csak a borsóka falából készítenek homogenizátumot. Bizonyos esetekben (3) a vezikuláris folyadékot is használják antigénként. A homogenizátumokat rendszerint lecentrifugálják, hogy eltávolítsák a sejt törmelékeket, sejtmagokat, stb. A centrifugálást 15.000-20.000 g mellett végzik 15-30 percig. A teljes homogenizátumot acetonnal

csapják ki, hogy a lipidek nagy részét eltávolítsák, s ezt komplement kötési reakcióban (4) használják fel. A nyers vagy teljes antigént különböző típusu immunassay-kben használják fel, mint például passzív hemagglutinációban (5, 3), immun-elektroforézisben (1) és enzim-immunassay-ben (ELISA; 1, 6, 7).

Kuhn és mtsai (8) leírtak egy ELISA módszert, amelyben a borsóka teljes homogenizátumát használták fel és a teszt érzékenységét a proteinek közül való egy csoport antigénnek tulajdonították. Ezeket az antigéneket nem tisztították és specifitásukat sem ellenőrizték. A teljes homogenizátum antigén természetű lipideket és szénhidrátokat tartalmazott a proteinek kivül, amelyeket Western blot analizissel tettek láthatóvá és amelyekről megállapították, hogy immunogének. A nem protein antigének hozzájárulását az ELISA érzékenységéhez nem igazolták. Egy B antigénnek nevezett szimpla antigént - mely fibronektin tulajdonságokat fejtett ki - használtak az ELISA-ban, de az érzékenysége nem volt kielégítő (9).

A parazita teljes homogenizátuma, mint antigén, számos hátrányt jelent az immundiagnózisban: (i) számos olyan epitópot tartalmaz, amelyek immunológiai keresztreakciót adnak más CNS kórokozókkal (lásd lentebb); (ii) kimutatták, hogy számos parazita bélféreg közös keresztreakáló antigéneket tartalmaz (10). A fejlődő országokban - ilyenek a következők: India, Mexikó, Brazília, Kína, Thaiföld, továbbá középamerikai és ázsiai országok - ahol a lakosság között nagyon általános a parazita fertőzöttség, a népesség tekintélyes része tartalmaz szérum antitesteket e keresztreakáló antigénekkal szemben.

Ha ilyen egyéneket olyan betegségek támadnak meg, amelyek át-
törnek a vér-liquor gátat, a szérum-antitestek be tudnak jutni
a cerebrospinális (agyi-gerincvelő) folyadékba (cerebrospinal
fluid = CSF) és a cysticercosis diagnózisát tévesen pozitív
eredményekkel akadályozhatják.

Mivel a teljes homogenizátum nem volt specifikus, meg-
próbálták azonosítani és tisztítani faj-specifikus és szövet-
specifikus antigéneket, azaz olyan antigéneket, amelyek a
scolex-ből és a vezikuláris folyadékból származnak. A Taenia
soliumból két polipeptidet - az egyik molekulatömege valószí-
nűleg 26.000, a másiké körülbelül 8.000 volt - azonosítottak
faj-specifikus antigénekként. Immunoblot vizsgálatban ezek az
antigének a Taenia solium-mal fertőzött betegekből származó
szérummal reagáltak, de nem reagáltak olyan szérumokkal, ame-
lyek más bélféreggel fertőzött betegekből származtak (11).
Ezeknek az antigéneknek az érzékenységet és specificitását
más rokon CNS zavarokkal kapcsolatban még nem bizonyították.
Egy antigén, amelyet vezikuláris folyadékból tisztítottak olyan
monoklonális antigén használatával, amelyet a vezikuláris folya-
dék össz proteinjével szemben termeltek, az immundiagnózisban
nagyon specifikusnak bizonyult, de hiányzott a kívánt érzékeny-
ség, ami hasznos lett volna az NCC észlelésében (12). A mono-
klonális antitestek segítségével tisztított valószínűleg körül-
belül 80.000 és körülbelül 10.000 molekulatömegű scolex speci-
fikus proteinek 100 %-os érzékenységet biztosítanak a cysticer-
cosis szerodiagnózisában. Azt állították, hogy ezek az antigének

hasznosak voltak a taeniasis és a cysticercosis megkülönböztetésében. Hasznosságukat a neurocysticercosisnak más szisztémás cysticercosistól való megkülönböztetésben nem vizsgálták (13).

A teljes homogenizátum antigénként való használatának hátrányait a feltalálók laboratóriumában végzett vizsgálatok is alátámasztják (14): a tanulmányt az alábbiakban foglaljuk össze:

A borsókákat homogenizáltuk és ultrahanggal kezeltük (8x30 másodperces behatás). A homogenizátumokat 1 %-os SDS-ben (nátrium-dodecil-szulfát) oldottuk fel és 1 % β -merkapto-
-etanollal kezeltük 100°C-on, majd gélszűrést végeztünk Sephacryl S-300 oszlopon. Az elválasztással három frakciót kaptunk:

- I. frakció: >66 kD molekulásúlyu borsóka antigének,
- II. frakció: 25-66 kD molekulásúlyu borsóka antigének,
- III. frakció: 14-35 kD molekulásúlyu borsóka antigének.

A gélszűréssel kapott három csúcs-frakciót SDS-PAGE módszerrel analizáltuk (lásd az 1. ábrát).

Az 1. ábra magyarázata:

1-es nyomsáv: harmadik csúcs

2-es nyomsáv: második csúcs

3-as nyomsáv: első csúcs

4-es nyomsáv: molekulatömeg markerek (94, 67, 43, 30, 20,1 és
14,1 kD)

A három frakció molekulatömeg tartományát fent ismertettük.

A cysticercosis antigének fenti három frakciójának alkalmazásával a következőképpen végeztük az ELISA vizsgálatot:

Különböző neurológiai betegektől taláalomra gyűjtött CSF-ekből 150 μ l-eket vizsgáltunk a három frakcióval szemben. Dynatech féle 96 tartályos mikrotitráló lemezeket fedtünk 50 mM bikarbonát pufferben (pH= 9,6) készített 5 μ g/ml koncentrációjú antigénekkal (100 μ l/tartály) egy éjszakán át, a blokkolást 2 %-os BSA-val (BSA = bovin szérum albumin) végeztük. A cerebrospinális folyadékokat 1/25, 1/125 és 1/625 higitásban vizsgáltuk. A megkötött humán IgG-t nyúl anti-humán IgG - peroxidáz konjugátummal (Sigma, 1:1000 higitás) mutattuk ki. A kromogén orto-fenilén-diamin (4 mg/10 ml) és a szubsztrátum 0,3 %-os hidrogénperoxid volt.

Az 1. táblázat a 150 minta vizsgálati eredményeit mutatja be.

1. táblázat

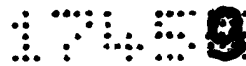
Csoport	Diagnózis	Esetszám	I. frakció									II. frakció									III. frakció								
			+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+									
1.	Cysticercosis CAT-SCAN-nel bizonyított	6	6	-	-	4	2	2	-	2	2	2	2	-	2	2	2	-	2	2									
2.	Tuberkulotikus meningitis (TBM) 11 tenyésztéssel bizonyított	11	5	4	1	4	3	4	4	3	4	1	2	-	1	2	2	-	2	2									
3.	TBM-re erősen gyanus	24	3	5	4	4	1	5	3	2	3	2	3	-	2	3	2	-	3	3									
4.	Krónikus meningitis etiológiája kinyomozhatatlan	20	-	5	4	-	4	5	-	4	5	-	6	-	-	6	-	-	-	6									
5.	Pyogen meningitis tenyésztéssel bizonyított	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-									
6.	Sclerosis multitplex (svéd minták)	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	∞	-	-	-	-	-	-	-									
7.	Agy-tumороk + Dementiák + Epilepszia + Virusos encephalitis	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-									

+++ CSF-ek +ve 1/625 higitásig;

++ CSF-ek +ve csak 1/125 higitásig;

+ CSF-ek +ve csak 1/25 higitásig.

A 2., 3. és 4. csoportban a 490 nm-en mért átlag abszorpciók 3-5-ször kisebbek voltak, mint az 1. csoportban.



Az eredményekből az alábbi következtetéseket vontuk le.

Bár a teszt elég érzékeny volt minden neurocysticercosis eset felismerésében, a legtöbb tévesen pozitív eredményt a tuberkulotikus meningitis-es esetek adták. Tehát a tesztnek nem lehet hasznát venni ott, ahol mindkét betegség elterjedt.

Kimutattuk, hogy a tuberkulotikus meningitis-es CSF-ek reakciója a borsóka antigénekkal annak tudható be, hogy a Mycobacterium eredetű antigének és a borsóka antigének egymással keresztreagálnak.

1. Az ultrahanggal feltárt Mycobacterium tuberculosis minták gátolják a cysticercosis pozitív CSF-ek kötődését a borsóka antigénekhez, de a reakciót nem szüntetik meg teljesen.

2. Ez a gátlás a Mycobacterium eredetű antigének koncentrációjának növelésével megnő.

3. Az ultrahangozott Mycobacterium eredetű anyagok ellen nyúlban termelt antiszérum a borsóka antigénekkal reagál.

A fenti megfigyelések szerint a nyers antigének valóban tartalmazznak olyan epitópopokat, amelyek más CNS kórokozókkal keresztreagálnak.

A borsókák olyan többsejtű organizmusok, amelyeket a makrofágok vagy a granulociták vagy más antigén bemutató sejtek nem tudnak úgy fagocitálni és feldolgozni, mint az egysejtű mikroorganizmusokat. Ennélfogva a humán immunrendszer ritkán szenzitizálódik a paraziták minden proteinjével szemben, még olyan immunológiailag privilegizált területen sem, mint a CNS. Tehát azok az antigének, amelyeket ezek a paraziták a gazda-

szervezet test-folyadékaiába kiválasztanak (exkretálnak) vagy elválasztanak (szekretálnak) vagy kibocsátanak (elnevezésük: E-S antigének) immunológiailag nagyon fontosak. Számos parazita bélféreg E-S-antigénjeit úgy izolálták, hogy a különböző fejlődési fokon lévő bélférget in vitro szövettenyésztő táptalajon tartották fenn és az antigéneket a tápoldatból tisztították (15). A *Cysticercus cellulosae*-t szintén fenntartották in vitro szárummal és szövet-kivonatokkal (16). Amikor ezeket a parazitákat rövid időtartamokra Dulbecco féle minimál esszenciális tápoldatban (DMEM = Dulbecco's minimal essential medium) vagy foszfáttal pufferolt konyhasó oldatban (PBS = phosphate buffered saline) tartották és ^{14}C aminosavakkal kezelték, kitűnt, hogy e paraziták metabolikusan aktívak (17). Azonban csak elhanyagolható mennyiségű radioaktív jelzett protein volt kimutatható a tápoldatban. Ezen antigéneknek az immun-diagnózisban való használhatóságát soha nem vizsgálták.

A találmány azon a feltételezésen alapul, hogy a *Cysticercus cellulosae* E-S antigénjei, amelyeket a paraziták in vitro fenntartása révén kapunk, szoros rokonságban vannak azokkal az antigénekkal, amelyek a borsókából származnak és részét képezik a borsóka in vivo anyagcsere folyamatainak. Tehát ezek az antigének specificitást és szenzitivitást biztosíthatnak azoknak az immunológiai vizsgáló módszereknek, amelyeket a betegek test-folyadékaiban - ilyen például a CSF és a szérum - az antitestek kimutatására szánunk. Ugyanezen antigének vagy ezen antigének bizonyos lebomlott termékei megtalálhatók a betegek CSF-eiben.

Ez szolgáltatna alapot az antigén kimutatáson alapuló immun-
diagnózis kifejlesztésének. Köztudomásu, hogy az E-S antigének
ellen poliklonális monospecifikus vagy monoklonális antitestek
termelhetők, amelyeket azután fel lehet használni egy ilyen
antigén kimutatási vizsgálatban. Minthogy néhány ilyen antigén
protektív immunitást ad a gazda-szervezetnek, ezen antigéneket
fel lehet használni a *Cysticercus cellulosae* fertőzés neutra-
lizálására szolgáló vakcinák kifejlesztésében.

A találmány egy új módszert ír le a *Cysticercus*
cellulosae hosszú ideig tartó fenntartására szérum-mentes sejt-
-tenyésztő tápoldatban és leírja, hogy a parazita által a táp-
oldatba kibocsátott antigének felhasználhatók az NCC immundiag-
nózisára, amely magába foglalja a beteg eredetű CSF és az E-S
antigének kölcsönhatását. Itt a hangsúly az antigének haszná-
latán van az NCC azonosításában anélkül, hogy a szisztémás
cysticercosis más formáinak bármilyen zavaró hatása érvényesül-
ne. A leirt új diagnosztikai módszert fel lehet használni az
emberi fogyasztásra szánt sertésnek *Cysticercus cellulosae* fer-
tőzöttségének a diagnosztizálásában is.

- A borsókák eredete és fenntartása

A borsókával fertőzött sertéshúst vágóhídról szerezzük
be. A sertéshúst úgy tisztítjuk meg a szennyezésektől, hogy a
felületét etanollal töröljük át. A borsókákat a ciszta falának meg-
sértése nélkül kivágjuk (a sérült borsókákat eldobjuk) és peni-
cillin G-t (1.000 E/ml), gentamicint (40 µg/ml) és amfotericin
B-t (5 µg/ml) tartalmazó izotoniás konyhasó oldatba tesszük. A

borsókákat antibiotikumokat (mint fent) tartalmazó steril konyhasó oldattal gondosan mossuk. A borsókákat ezután szérumentes RPMI 1640 vagy Earl sókkal vagy Hank sókkal kiegészített Eagle féle minimál esszenciális (MEM) tápoldattal mossuk. A borsókákat ezután penicillin G (1.000 E/ml) és gentamicin (40 µg/ml) tartalmu RPMI vagy Eagle MEM tápoldatba tesszük 37°C-on 5 % CO₂ tartalom mellett.

- E-S antigén gyűjtése

A tápoldatot az első 24-60 óra folyamán legalább kétszer cseréljük és eldobjuk, hogy biztosítsuk a gazda-komponensek teljes eltávolítását. Előnyös, ha a tápoldatot az első 48 óra folyamán kétszer cseréljük. A tápoldatot ettől kezdve olyan időközönként addig cseréljük, amíg a borsókáknál nem kezdődik meg az evagináció. Gyakorlati szempontokból az az előnyös, ha a tápoldatot minden 24 órában összegyűjtjük. A borsókák életképességét a ciszta falának kontrakciója révén ellenőrizzük, s ezt fordított mikroszkóppal figyelhetjük meg. Az evagináció a hatodik naptól kezdve észlelhető. A tápoldatot az összegyűjtés után azonnal centrifugáljuk 104.000 g mellett 60 percig, hogy eltávolítsuk az oldhatatlan törmelékeket és a membrán szennyezéseket. A felüluszóhoz para-metil-szulfonil-fluoridot (2 mM), para-klór-merkuri-benzoátot (0,06 %) és ammónium-szulfátot adunk 90 % telítésig, miközben az oldat pH-ját 7-7,4-en tartjuk. A kicsapást 4°C-on végezzük, majd a csapadékot centrifugálással - 15.000 g; 30 perc; 4°C - gyűjtjük össze. A csapadékot 50 mmólos nátrium-foszfát pufferben (pH= 7,4) oldjuk fel,

majd ugyanezen pufferrel szemben - gyakori cserével - 48 órán át alaposan kidializáljuk. A membrán fragmentumokat más eljárás szerint, a szakterületen ismert más módszerekkel, így membrán szűrővel is eltávolíthatjuk. Hasonlóképpen az antigéneket is izolálhatjuk más módszerekkel, például ultraszűrővel. Az oldat UV spektruma 278-280 nm-en abszorpciós maximumot mutat. A Schaffner és Weissmann (18) féle eljárással mért protein mennyisége 25-35 μg protein/borsóka/24 óra volt, ha a borsókák fenntartása 15 borsóka/10 ml parazita sűrűségnek felelt meg.

E proteineket nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) vizsgáltuk, a gélt Coomassie blue R színezéssel festettük meg. Az eredmény a 2. ábrán látható.

A 2. ábra magyarázata: 7,5-15 % grádiensben SDS-PAGE analízissel vizsgált E-S proteinek Coomassie kékkel festve.

- 1-es nyomsáv: nagy molekulatömegű markerek (116, 97,4, 66, 45 és 29 kD);
- 2-es és 3-as nyomsáv: ammónium-szulfáttal kicsapott E-S proteinek (két független készítmény);
- 4-es nyomsáv: kis molekulatömegű markerek (94, 67, 43, 30, 20,1 és 14,4 kD).

A kapott fő protein sávok valószínű molekulatömege körülbelül 97.000, 66.000, 50.000, 38.000, 28.000 dalton. Egy elválasztatlan protein keverék molekulatömege 10.000-14.000 dalton tartományban van. Több kisebb sáv szintén látható.

- Az E-S proteinek de novo szintézisének bizonyítása.

Az első 48 óra eltelte után a borsókákat a táptalajból átvittük ^{35}S -metionint (40 μCi /borsóka) tartalmazó metionin deficiens tápoldatba. Különböző időpontokban borsókákat és tápoldat mintákat vettünk. A borsókákból kivágtuk a borsóka falát és a scolexet, majd ezeket homogenizáltuk. A homogenizátumokat 12 %-os SDS-PAGE analizissel vizsgáltuk és fluorografáltunk. A tápoldatot acetonnal csaptuk ki, 12 %-os SDS-PAGE analizist végeztünk és fluorografáltunk. A ^{35}S -metionon beépülését észleltük mind a borsóka fal proteinekbe, mind a scolex proteinjeibe. A 48. órára számos protein jelent meg a táptalajban (3. ábra).

A 3. ábra magyarázatai: ^{35}S -metioninnal jelzett exkréciós/szekréciós proteinek autoradiogrammja. Három borsókát elkülönítve inkubáltunk 48 órán át 1-1 ml, egyenként 40 μCi ^{35}S -metionint tartalmazó tápoldatban. A tápoldatot összegyűjtöttük, ultracentrifugáltuk és a felüluszót acetonnal kicsaptuk. Mindegyik nyomsáv egyetlen borsóka proteinjeit reprezentálja.

A 3. ábrán látható, hogy számos aktivan szintetizált protein exkretálódott-szekretálódott a tápoldatba, mintegy a parazita anyagcsere tevékenységének részeként.

Ha borsókákat in vitro, szérum-mentes tápoldatokban tartunk fenn, az anyagcsere körfolyamat részeként bizonyos protein antigének jelennek meg a tápoldatban vagy exkréciós folyamat vagy szekréciós folyamat eredményeként. A scolex evaginációja előtt izolált antigének a lárva állapot antigénjeit képviselik. A táplálmány oltalmi körébe tartoznak az antigének, ezek előállítására

szolgáló eljárások, felhasználásuk az NCC diagnózisa és lehetséges prognózisa érdekében, valamint tervezett felhasználásuk a *Cysticercus cellulosae* fertőzés elleni vakcina termelésben. Az itt leírt diagnosztikai módszert az emberi fogyasztásra szánt sertésekben a cysticercosis diagnózisára is fel lehet használni.

Módosított formát jelenthet például a poli-etilén-glikolos kötés vagy e keresztkötés más proteinekkal vagy a bifunkciós reagensek vagy az emésztés proteázokkal. A találmány az aktív humán NCC egy olyan diagnosztikai módszerére is vonatkozik, amely egy diagnosztizálandó betegből származó reaktív CSF-et tartalmaz, valamint az *in vitro* fenntartott *Cysticercus cellulosae* által exkretált vagy szekretált antigének közül legalább egy olyan antigént, amelynek a valószínű molekulatömege - SDS-PAGE módszerrel meghatározva - körülbelül 97.000 vagy 66.000 vagy 50.000 vagy 38.000 dalton, vagy tartalmazza az említett antigének keverékét.

Az 1. és a 2. példa ezen antigéneknek ELISA rendszerben való használhatóságára vonatkozik. A módszer a különböző neurológiai zavarokban szenvedő betegek CSF-ében az anti-cysticercosis antitestek kimutatására szolgál. A 3. és a 4. példa fontos antigének további azonosítására vonatkozik. Az antigének azonosítását molekulatömegük alapján immunprecipitációval végezzük a betegekből származó CSF-ek felhasználásával. Megjegyezzük, hogy a példákkal nem óhajtjuk korlátozni a szabadalom oltalmi körét.

1. példa

Dynatech féle 96 tartályos mikrotitráló lemezeket a fent leírtak szerint gyűjtött szekréciós/exkréciós proteinekkal fedünk -

koncentráció: 5 μ g protein/ml (100 μ l/tartály) - egy éjszakán át szobahőmérsékleten. A lemezeken fennmaradt protein kötő helyeket PBS-ben készített 2 %-os marha szérum albuminnal (BSA) blokkoljuk. A CSF-ek 0,05 % Tween 20 tartalmu PBS-sel (PBST) készített 1/25, 1/125 és 1/625 higitásait bemérjük és 2 órán át 37°C-on inkubáljuk. Inkubálás után a tartályokat háromszor mossuk PBST-vel. Nyúl anti-humán IgG-peroxidáz konjugátumból - 1:1000 higitás PBST-ben - 100 μ l-t mérünk be tartályonként és 2 órán át 37°C-on inkubálunk. Ezután a tartályokat háromszor mossuk PBST-vel. A megkötött konjugátum meghatározását 20 percen belül véghezvük orto-fenilén-diamin, mint kromogén (4 mg/10 ml) és H₂O₂ mint szubsztrátum használatával. A reakciót 50 μ l és 4 n H₂SO₄ hozzáadásával állítjuk le, az abszorpciót 490 nm-en, Dynatech MR 700 ELISA reader készülékben mérjük. Az 1/100 higitásu CSF-re kapott 0,10-nél nagyobb abszorpciós értékeket pozitívnak tekintjük. Az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

Diagnózis	Minták száma	Pozitív minták száma
Cysticercosis		
Post mortem bizonyított	2	1
Sebészetileg bizonyított	2	2
Klinikai gyanu	7	6
Japán encephalitis	30	0
IgM befogó ELISA +ve		
Tuberkulotikus meningitis	25	0
Tenyésztéssel + sebészetileg bizonyított		
Tuberkulotikus meningitis	71	2
(vagy Ag +ve vagy At +ve)		(abszorpció: 0,15 490 nm-en)

A táblázat azt mutatja, hogy ez az antigén sokkal jobb, mint a nyers antigén és az immunológiai reakciónak specificitást biztosít.

2. példa

Ez a példa az exkréciós-szekréciós antigének diagnosztikai értékének kettős vak vizsgálatát írja le. Ez a teszt módszer kiküszöböli a vizsgálatot végző személy tévedéseit.

Biztosan diagnosztizált neurológiai zavarokban szenvedő betegektől vett 37 CSF mintát 1-től 37-ig terjedő sorszámmal jelölt meg egy elfogulatlan, nem a feltalálók közül való személy. A mintákat 3 alikvot részre osztottuk. A feltalálók két független la-

boratóriuma kapta meg a CSF mintákat, s mindkét laboratóriumban 2 személy, összesen tehát 4 személy végezte el egymástól függetlenül az 1. példában részletesen leírt ELISA vizsgálatot. A vizsgálatot végző 4 személy táblázatba foglalta az eredményeit. Az eredményeket az elfogulatlan megfigyelővel közölték. Mind a négy vizsgálatot végző személy eredményei azonosak voltak. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaljuk össze.

3. táblázat

Diagnózis	Minták száma	Pozitív minták száma
Neurocisticercosis	3	3
Gerincvelői érzéstelenítés (normál kontroll)	8	0
Post operatív meningitis (tenyésztéssel bizonyított)	5	0
Japán encephalitis	7	0
Pyogen meningitis (Pneumococcus-os)	3	0
Cryptococcus-os meningitis (tenyésztéssel bizonyított)	1	0
Tuberkulotikus meningitis (tenyésztéssel bizonyított)	2	0
Thorakális gerincvelői nyomás (Thoracic cord compression)	2	0
Koponya-csigolya illeszkedési rendellenesség (Cranio Vertebral Junction Anomaly)	1	0

(3. táblázat folyt.)

Csigolyaközi porckorong prolapsus	1	0
Mozgató neuron betegség	1	0
Ataxiás neurózis	1	0
Hemiplégia (féloldali bénulás)	1	0
Pseudobulbáris bénulás	1	0

A fenti eredmények igazolják, hogy az exkréciós-szekréciós antigének 100 %-os szenzitivitást és 100 %-os specificitást biztosítanak a betegektől vett CSF-ben lévő antitestek kimutatására kifejlesztett diagnosztikai tesztnek.

3. példa

A találmány szerinti szekréciós/exkréciós antigéneket ^{125}J -al jeleztük Jodogen módszer szerint. A jelzett proteineket ismert neurocisticercosis-os, tuberkulotikus meningitis-es és különböző más neurológiai zavarokat mutató esetekből származó CSF-ekkel inkubáltuk. Az immunkomplexeket nyúl anti-humán IgG-vel, hordozó humán IgG-vel hoztuk össze és az egész oldatot 2,5 %-os polietilén-glikolban készítettük el. A precipitátumokat 7,5-15 % SDS-PAGE grádiensben analizáltuk, majd elvégeztük az autoradiografálást (lásd a 4. ábrát).

A 4. ábra magyarázata: az ábrán a ^{125}J -al jelzett szekréciós/exkréciós proteinek és a beteg CSF-ek reakciójából eredő immunprecipitátumok autoradiogrammja látható. A CSF 1:3 higitárait (30 μl) inkubáltuk az E-S proteinekl (3.10 cpm) és az immunprecipitátumok kicsapása a leírás szerint történt.

1-es nyomsáv: kontroll - CSF nélkül; 2-es, 3-as és 4-es nyomsáv: neurocysticercosis eredetű CSF; 5-ös nyomsáv: tuberkulotikus meningitis; 6-os, 7-es és 8-as nyomsáv: más neurológiai zavarok.

Az immunprecipitációban szignifikáns módon a körülbelül 97 kD, 66 kD, 50 kD és 38 kD valószínű molekulatömegű proteinek jelentek meg.

4. példa

E-S proteineket jelöltünk ^{35}S -metioninnel úgy, hogy a borsókákat in vitro olyan metionin deficiens tápoldatban tartottuk fenn, amely ^{35}S -metionint tartalmazott. Ezeket a proteineket a 2. példa szerinti CSF antitestekkel immunprecipitáltuk. Az immunprecipitátumok SDS-PAGE fluorográfiás vizsgálatát az 5. ábrán mutatjuk be.

Az 5. ábra magyarázata: Különböző neurológiai zavarokban szenvedő betegektől származó CSF-fel immunprecipitált ^{35}S -jelzett E-S protein autoradiogrammja. A 9-es és az 5-ös nyomsáv az NCC betegektől levett CSF-ek immunprecipitátumát képviseli.

Itt is, mint a 3. példában, 97, 66 és 50 kD proteineket tartalmazott az immunprecipitátum.

A 97.000 dalton molekulatömegű antigén vizsgálata.

I. Részleges nukleinsav szekvencia.

A *Cysticercis cellulosae* teljes poliA + RNS-éből a lambda gt 11-ben cDNS gyűjteményt hoztunk létre (19). A *Schistosoma mansoni*-ből tisztított paramiozin ellen nyúlban termelt hiperimmun szérumot használva egy körülbelül 2,5 kb méretű cDNS klónt azonosítottunk és izoláltunk. A kétszálu DNS szekvenálás (20) a következő szekvenciát eredményezte:

1. TCTCAAGCAGXACGTCACACTGACAGTACATATGTACACTGACTCTGCTTCACATAT
TATATTAGTTACTAGCAAGCACACACACGTCGAC
2. TGAGTACGTCXTGTAGTCTGTGCGTATGTGTGTAGTTCTGTCGTXGATCACTAACTTA
ATATTAGAGTCAGXAGGTCAGTGTGCATGTCATGTCATGTAT

II. Részleges aminosav szekvenciák.

A Coomassie késsel festett SDS-poliakrilamid gélből, amelyben E-S antigéneket elektroforetizáltunk, a 97.000 molekulatömegű antigént elektroeluáltuk (21). Az elektroeluált proteint kicsaptuk az SDS eltávolítása céljából. A proteint ezután TPCK-val (N-tozil-L-fenilalanin-klórmetil-kezon) kezelt tripszinnel emésztettük. A tripszines peptideket RP 300 (C8) oszlopon (0,46x25 cm) választottuk el, melyet előzőleg az A oldattal (0,1 % TFA vizes oldata; TFA = trifluor-ecetsav) hoztunk egyensúlyba. A peptideket a B oldat (0,085 % TFA tartalmu 70 %-os acetonitril) lineáris grádiensében - 0-65 % 40 perc alatt - eluáltuk. A peptid tartalmu frakciókat vákuumban szárazra pároltuk. Ezeket a peptideket szekvenáltuk.

4. táblázat

A 97.000 molekulatömegű peptidből származó néhány tripszines peptid aminosav szekvenciája

Aminosav szekvencia	Peptid
V K L D S A K	T 14
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

SZAKIRODALOM

1. Espinoza, B. et.al (1982) in A.Flisser et al (ed) Cysticercosis Present state of knowledge and perspectives 163-170 Academic Press, New York.
2. Rosas, N. et.al. (1986) Arch. Neurol., 43, 353-356.
3. Larralde, C.et.al. (1986) in Am.J.Trop.Med.Hyg., 35, 965-974.
4. Neito, D., (1956) Neurology 6, 725-738.
5. Powell, S.J. et.al. (1966), Ann.Trop. Med. Parasitol 60 152-158.
6. Diwan, A.R.et.al. (1982) Amr.J.Tro.Med.Hyg. 31 364- 369.
7. Estrada, J.E., and Kuhn, R.E., (1985) J.of Neurol. Sciences 71 39-48.
8. Kuhn, R.E. et.al. US Patent No. 4,740,456. (1988).
9. Espinoza, B.et.al. (1986), J.Clin.Microbiol. 24, 536-541
10. Espinoza, B.and Flisser, A, (1987) Arch.Investigative Medicine 17 (3) 299-312.
11. Gottestein, B. et.al. (1987) Trop.Med.Parsit. 38, 299-303.
12. Kim,S.I.et.al. (1986) Korean J.Parasitol. 24 145-158.
13. Nascimento,E. et.al.(1987)J.of Clin.Microbiol.25 1181-1185.
14. Suryanarayana,V.et.al. (1987) Abstract No. SVIIA-5, 37th Annual Conference of the Neurological Society of India, Hyderabad
15. Lightowers,M.W.,and Rickard, M.D., Parasitology (1988), 96, S123-S166.

16. J.Sotelo et al, J.Am.Med.Assoc. (1986), 256,893.
17. Diaz De Leon, L.et.al. (1982) in A.Flisser et al (ed) Cysticercosis Present State of knowledge and perspectives, 465-475, Academic Press, New York.
18. Schaffner, W.and Weissmann, C., (1973) Anal.Biochem. 56 502-514.
19. Huynh, T.V., Young, R.A., and Davis R.W., (1985) in DNA cloning Vol-1 A Practical Approach Ed. Glover, D.M., pp. 49-78 IRL Press, Washington.
20. Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., and Brow, M.A.D., (1988) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 85, 9436-9440.
21. Hunkapiller, M.W., and Lujan, E., in Methods in Protein Micro Characterization Ed. Shivley, J.E., (1986) pp. 89. Humana Press.

Szabadalmi igénypontok

1. A *Cysticercus cellulosae* exkréciós/szekrációs (E-S) antigénjeinek az alkalmazása a neurocysticercosis immundiagnózisában.
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a körülbelül 97.000, 66.000, 55.000 és 38.000 molekulatömegű antigéneket használjuk fel.
3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a körülbelül 66.000 és 38.000 molekulatömegű antigéneket használjuk fel.
4. Az 1., 2. és 3. igénypont bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy az immunassay-t a betegek testfolyadékaiban, így a cerebrospinális folyadékban (CSF) és a szérumban jelenlévő antitestek kimutatására használjuk.
5. Az 1., 2. és 3. igénypont bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy az immunassay-t a betegek testfolyadékaiban, így a cerebrospinális folyadékban (CSF) és a szérumban jelenlévő antigének kimutatására használjuk.
6. Eljárás a 2. és a 3. igénypont szerinti meghatározott antigének előállítására, azzal jellemezve, hogy a *Cysticercus cellulosae*-t in vitro tartjuk fenn.
7. *Cysticercus cellulosae* által exkretált/szekretált antigén azzal jellemezve, hogy molekulatömege - SDS-PAGE analízissel meghatározva - körülbelül vagy 97.000 vagy 66.000 vagy 50.000 vagy 38.000 dalton.

8. A 7. igénypont szerinti egy antigén azzal jellemezve, hogy ez egy feltehetően körülbelül 97.000 vagy 50.000 dalton molekulatömegű glükoprotein, SDS-PAGE meghatározás szerint.

9. A 7. igénypont szerinti egy antigén azzal jellemezve, hogy a körülbelül 38.000 molekulatömegű protein egy következő aminosav szekvencia részt tartalmaz: valin-glutaminsav-tirozintreonin-cisztein-treonin (VEYTCT).

10. A *Cysticercus cellulosae* által szekretált vagy exkretált antigén azzal jellemezve, hogy molekulatömege - SDS-PAGE analízissel meghatározva - körülbelül 97.000 vagy 66.000 vagy 50.000 vagy 38.000 dalton.

11. A *Cysticercus cellulosae* által szekretált vagy exkretált antigén azzal jellemezve, hogy glükoprotein, melynek valószínű molekulatömege - SDS-PAGE analízis szerint - körülbelül vagy 97.000 vagy 50.000.

12. A *Cysticercus cellulosae* által szekretált vagy exkretált antigén azzal jellemezve, hogy egy valin-glutaminsav-tirozintreonin-cisztein-treonin (VEYTCT) összetételű aminosav szekvencia részt tartalmaz.

13. A 7, 8, 9, 10, 11. és 12. igénypontok bármelyike szerinti antigén felhasználása a *Cysticercus cellulosae* fertőzés elleni vakcina előállításában.

14. Eljárás a 7, 8. és 9. igénypontban meghatározott antigén előállítására, azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll:

a) fertőzött sertéshúsból származó érintetlen és sértetlen borsókákat tartunk fenn in vitro szérum-mentes tápoldatban,

amely antibiotikumokat tartalmaz;

b) a fenntartás első 24-60 órájában minden antigént eltávolítunk azáltal, hogy a tápoldatot ismételten kicseréljük;

c) ezután, az evagináció bekövetkeztéig időközönként összegyűjtjük a tápoldatot;

d) eltávolítunk minden membrán darabot és

e) izoláljuk az antigéneket.

15. Módszer aktiv humán neurocysticercosis (NCC) diagnózisára azzal jellemezve, hogy a vizsgálandó betegből származó CSF-et az in vitro fenntartott *Cysticercus cellulosae* által szekretált vagy exkretált, valószínűleg körülbelül 97.000 vagy 66.000 vagy 50.000 vagy 38.000 dalton molekulatömegű (SDS-PAGE meghatározás szerint) antigének legalább egyikével vagy az említett antigének egy keverékével reagáltatjuk.

26 oldal

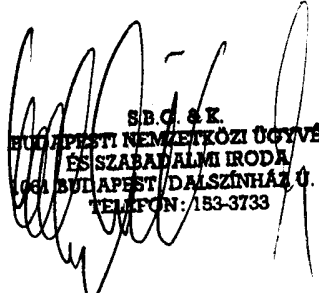
+ 5 rajzoldal

31 oldal

jellemező albumin

Inf

A meghatalmazott


 S.B.G. & K.
 BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
 ÉS SZABADALMI IRODA
 1061 BUDAPEST / DALSZÍNHÁZ U. 10.
 TELEFON: 183-3733

1472/90

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

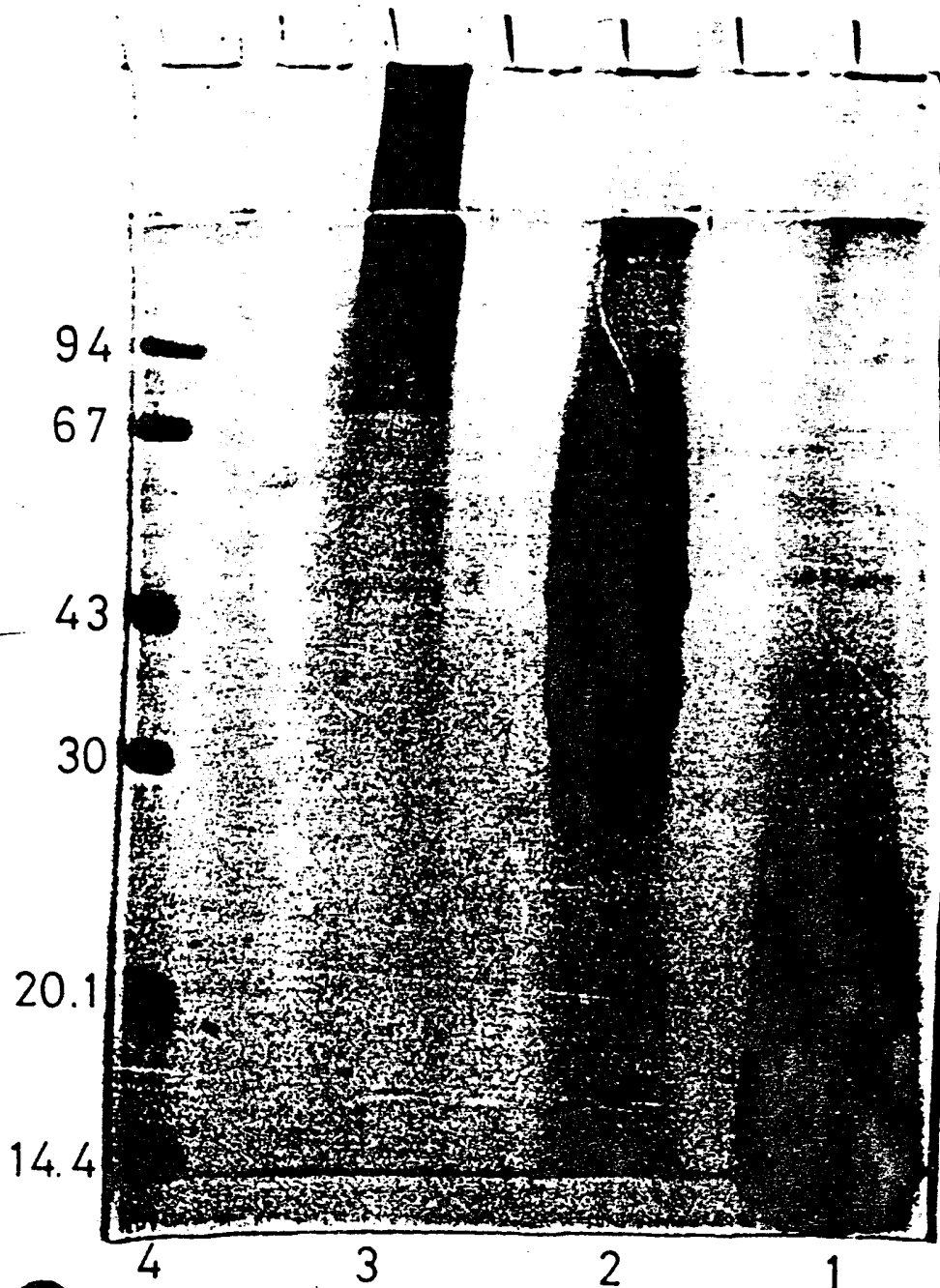
1759

56971--

54.310/BE

5/1

I. ÁBRA



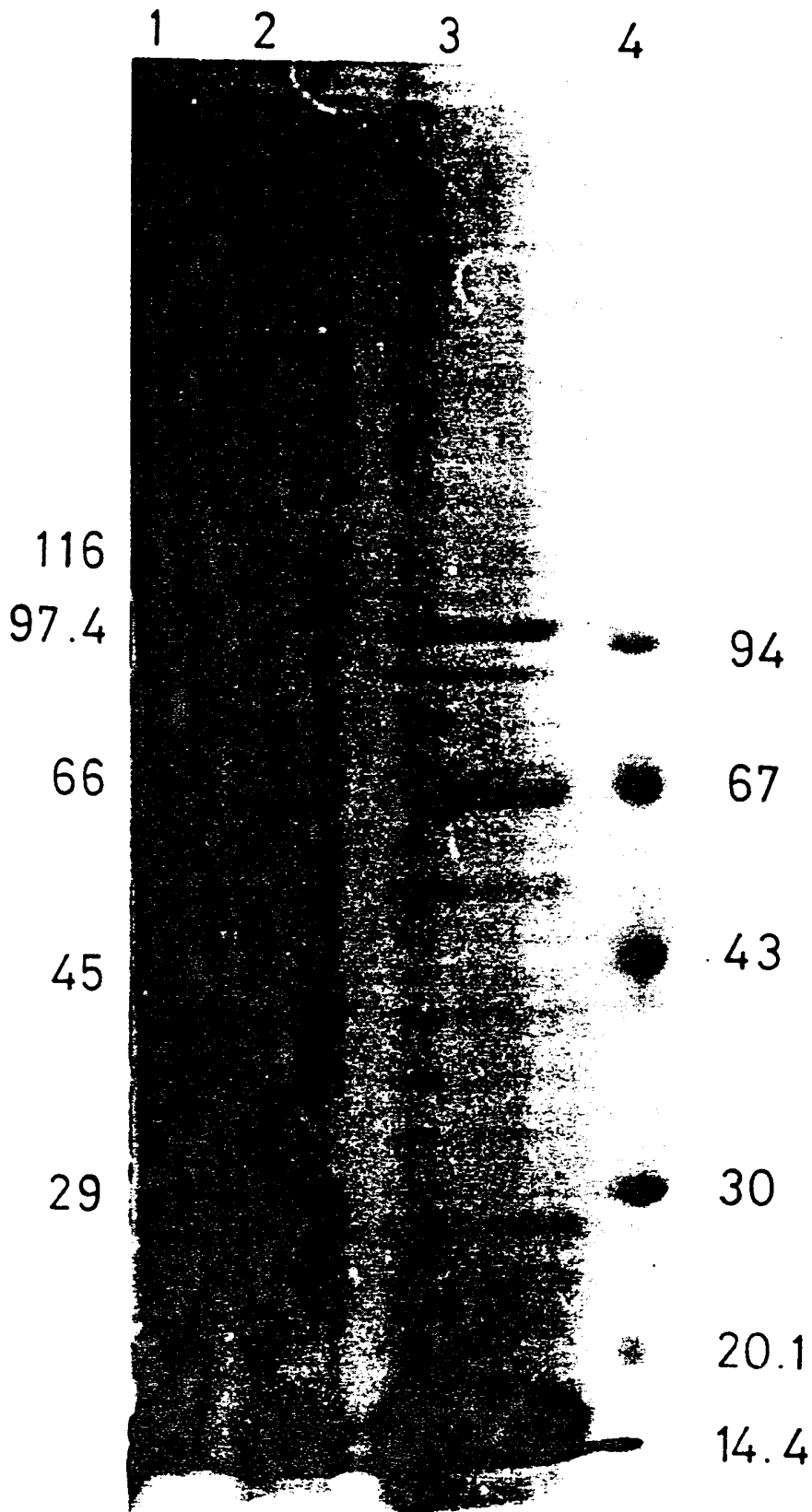
1983.05.24.
BUDAPESTI NEMZETI ÜGYVÉDI
ÉS SZERZŐJOGI IRODA
1081 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 183-3733

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

17459

54.310/BE

5/2



2. Á B R A

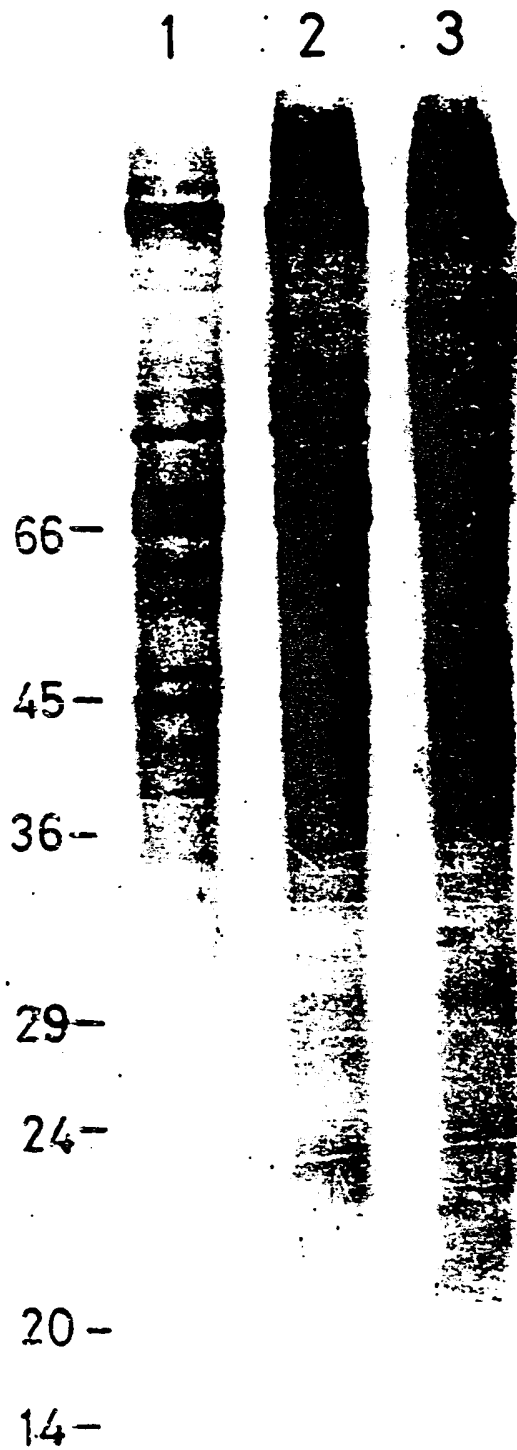
S.B.G. & F.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1081 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 183-3733

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

17459

54.310/BE

5/3



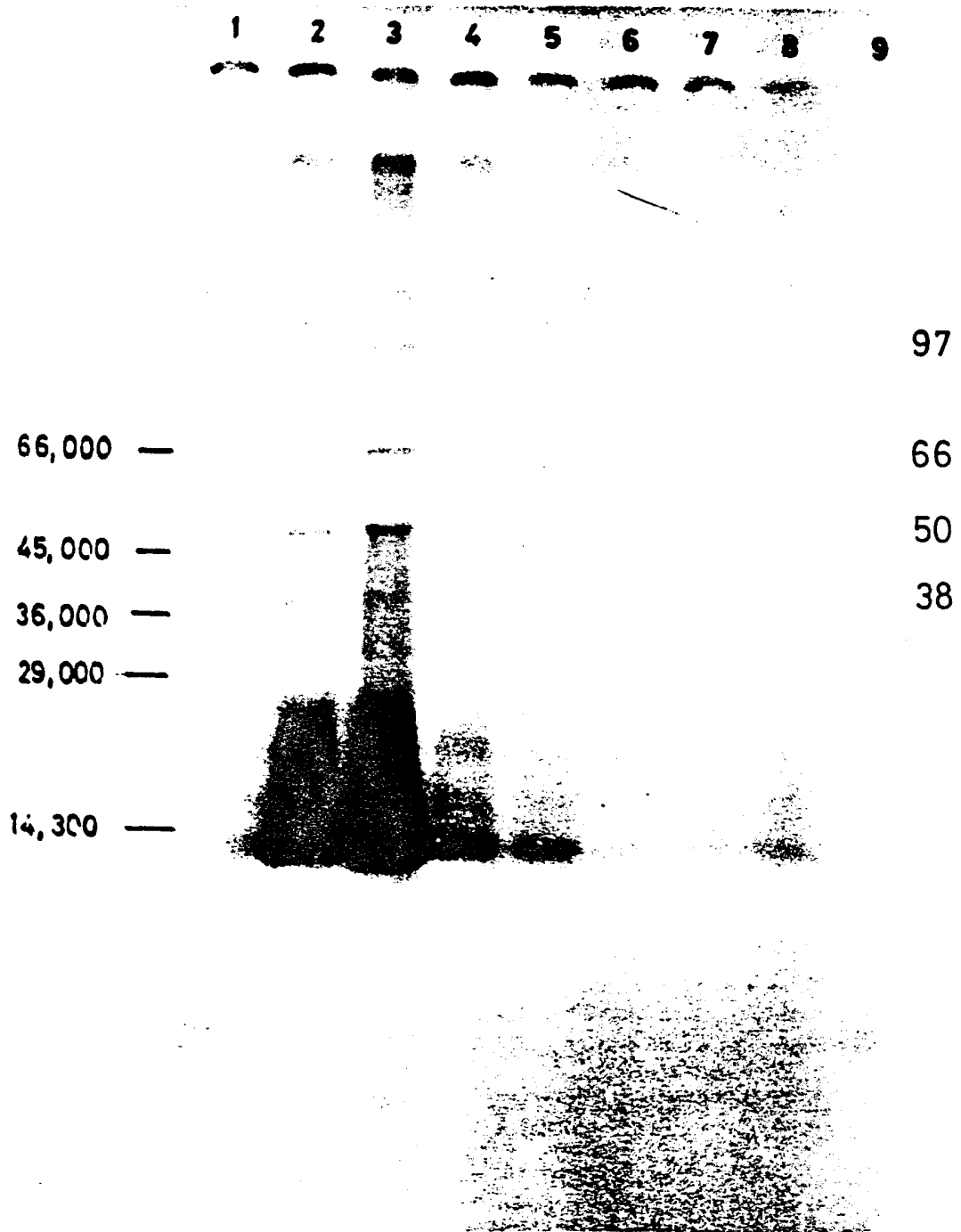
3. Á B R A

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

54.310/BE

5/4



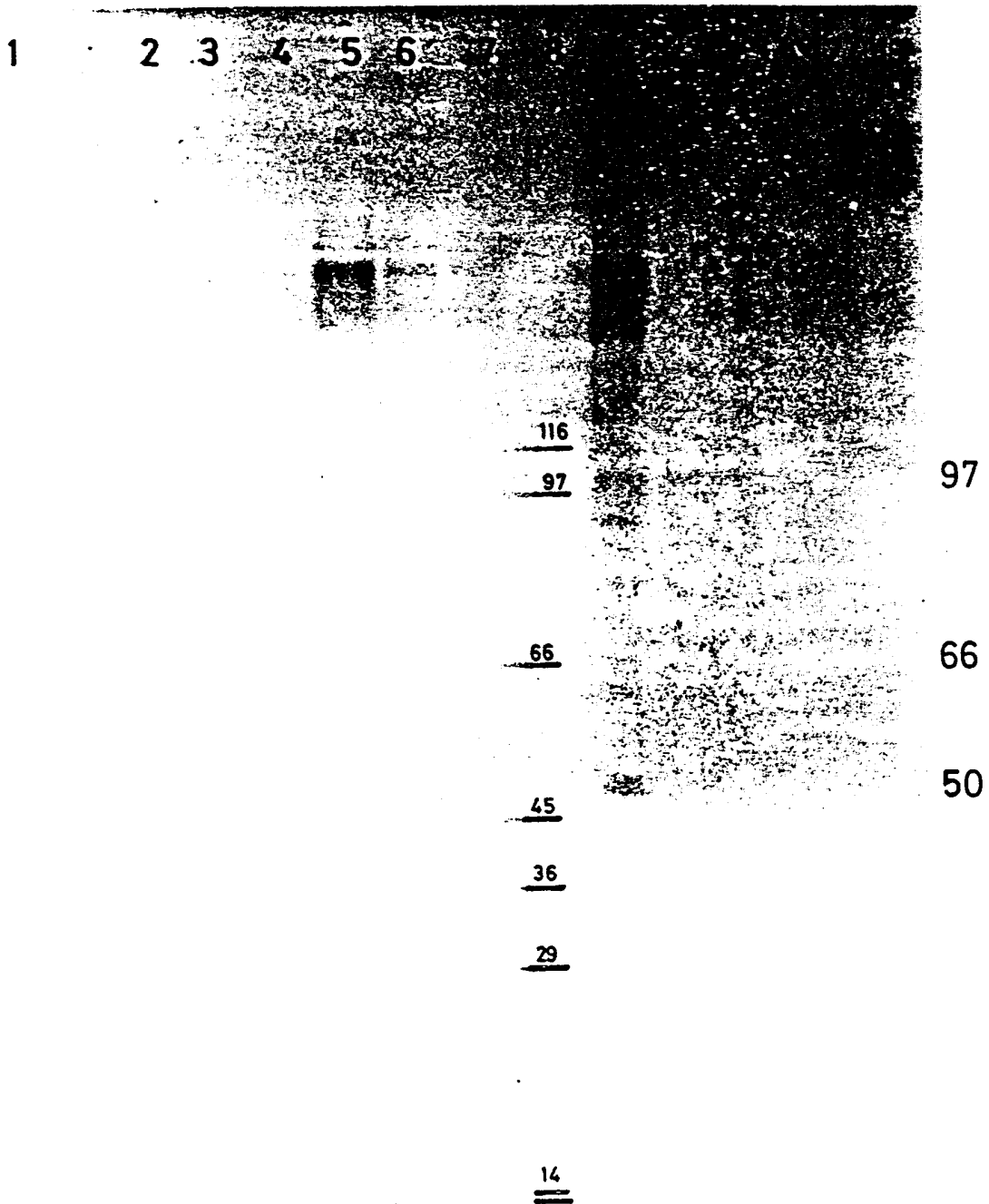
4. Á B R A

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ES SZAHADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSKÖZ U. 10.
TELEFON: 183-8733

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

54.310/BE

5/5



5. Á B R A

S.B.C. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3708