

(19)



(10) **LT 5228 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5228**

(51) Int. Cl.⁷: **G01N 33/53**

(21) Paraiškos numeris: **2003 069**

(22) Paraiškos padavimo data: **2003 07 16**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2005 01 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2005 06 27**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

neskelbiama

(73) Patent savininkas:

Uždaroji akcinė bendrovė Melofarma, Vivulskio g. 19, 2600 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Liucija JANICKAITĖ, Inpatra UAB, Šeškinės g. 59-53, LT-07162 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Gimdos kaklelio displazijų ir vėžio, susijusių su žmogaus papilomos virusais ankstyvos diagnostikos *in vitro* būdas

(57) Referatas:

Išradimas priskiriamas žmogaus sveikatos apsaugos sričiai. Panaudojus genų inžinerijos metodus, nustatoma ankstyva navikinė žmogaus papilomos virusų (ŽPV) vystymosi kryptis, leidžianti sustabdyti onkologinės ligos išsivystymą, laiku skiriant gydymo bei profilaktikos priemones.

Gimdos kaklelio displazijų ir vėžio, susijusių su ŽPV, ankstyvos diagnostikos *in vitro* būdu atlieka ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 kiekio nustatymą, panaudojant du tipus - porą fermentu pažymėtų monokloninių antikūnų, atpažįstančių skirtingus ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 antigenines determinantes, koreliuoja ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymą E7 kaip epitelinų ląstelių navikinės transformacijos biocheminį žymenį (markerį) ir, esant ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 40 pg/ml - 50 ng/ml skaitinei reikšmei, liudija gimdos kaklelio displazijų ir vėžio vystymosi užuomazgą.

Monokloninių antikūnų porą sudaro fermentu pažymėti monokloniniai antikūnai 716-281 ir 716-332.

Naudoja fermentu pažymėtų monokloninių antikūnų perteklių, didinančių ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 aptikimo intervalą 40 pg/ml - 50 ng/ml.

Išradimas priskiriamas žmogaus sveikatos apsaugos sričiai. Panaudojus genų inžinerijos metodus, nustatoma ankstyva navikinė žmogaus papilomos virusų (ŽPV) vystymosi kryptis, leidžianti sustabdyti onkologinės ligos išsivystymą, laiku skiriant gydymo bei profilaktikos priemones.

Papilomavirusinė infekcija – viena labiausiai išplitusių virusinių infekcijų. Per 50 % seksualiai aktyvių pasaulio gyventojų gyvenimo eigoje užsikrečia žmogaus papilomos virusais (ŽPV - žmogaus papilomos virusas, HPV - human papilloma virus, angl.). Šios infekcijos pasėkoje gali vystytis anogenitalinės srities ligos: gimdos kaklelio, vulvos, makšties, perianalinės srities vėžys bei genitalijų kondilomos (В. И. Киселев, Г. А. Дмитриев, А. А. Кубанова. Взаимосвязь вирусных инфекций передаваемых половым путем, и онкологических заболеваний урогенитального тракта. Вестник дерматологии и венерологии. 2000, No. 6, psl. 20-23).

Fig. 1 parodytas papilomavirusinės infekcijos vystymasis.

Daugeliu atvejų ši virusinė infekcija praeina be pasekmių, ir pacientas savaime pagyja, tačiau 10 % atvejų infekcija tampa lėtine.

Gimdos kaklelio vėžiu sergančių moterų kasmet pasaulyje užregistruojama apie 500000 šios ligos atvejų. Per pastaruosius 25 metus sergamumas ŽPV sąlygotu tiesiosios žarnos vėžiu išaugo 2 kartus. Vykdomos skryningo programos, siekiančios diagnozuoti ligą ankstyvoje stadijoje, daugeliu atvejų nėra veiksmingos dėl jų atsitiktinio pobūdžio ir informatyvumo stokos.

Gimdos kaklelio vėžys – antra pagal dažnumą moterų onkologinė liga. Nustatyta, kad dviejų onkobaltymų E6 ir E7, kuriuos koduoja ŽPV genomai, sintezė sąlygoja infekuotų ŽPV virusu epitelinių ląstelių malignizaciją. Pagrindinis vaidmuo indukuojant navikinę transformaciją tenka onkobaltymui E7.

Laboratorinė diagnostika

Papilomavirusinės infekcijos laboratorinė diagnostika, skirta ankstyvam viruso nešiojimo nustatymui, yra svarbi priemonė, leidžianti kontroliuoti infekcijos paplitimą ir savalaikį kompleksinį gydymo-profilaktikos priemonių panaudojimą, apsaugojantį nuo onkologinės ligos išsivystymo.

Tuo tikslu buvo naudojami citologiniai tyrimai (taip vadinami Pap-tepinėliai), nustatantys atipines, daugiabranduoles ląsteles. Tačiau, daugelio autorių nuomone, ši metodika išaiškina ne daugiau 30 % infekcijos nešiojų ir nebeatitinka šiuolaikiniams reikalavimams.

Ryšium su tuo buvo pradėta ieškoti laboratorinės analizės metodo, leidžiančio diagnozuoti ankstyvasias gimdos kaklelio displazijos stadijas. Viena iš šios paieškos krypčių – serologiniai analizės metodai, siekiantys ligonio serume aptikti antikūnus ŽPV onkobaltymams (Patent EP0406542 A method for detecting precancerous and cancerous cervical intraepithelium. Patent EP0523391 Use of HPV-16 E6 and E7-gene derivated peptides for diagnostic purpose).

Šiuose darbuose specifinių antikūnų nustatymui imunofermentinės ir radioimuninės analizių metodais buvo panaudotos ŽPV baltymų peptidinės determinantės. Tačiau šis būdas nepasiteisino, kadangi nebuvo nustatyta patikima koreliacija tarp antikūnų titro ir gimdos kaklelio vėžio.

Plačiai paplito ŽPV tipų nustatymo metodas panaudojant polimerazės grandininę reakciją (PGR) (B. И. Киселев, Г. А. Дмитриев, М.Ф. Латыпова. Полимеразная цепная реакция в диагностике урогенитальных инфекций. Пособие для врачей. Москва. 2000; U. Wieland, H.Pfister "Molecular diagnosis of persistent human papilloma virus infections". Intervirology, 1996,v.39, pp. 145-157). Metodas turi didelę diagnostinę vertę ir leidžia nustatyti atskirus ŽPV tipus (Patent WO00506645 Method and KIT for early cancer prediction, Patent US5679509 Methods and diagnostic aid for distinguishing a subset of HPV that is associated with an increased risk of developing cervical cancer dysplasia and cervical cancer).

Tačiau šio metodo panaudojimas veda prie hiperdiagnostikos, kadangi apie 80 % atvejų asmens infekavimas ŽPV yra trumpalaikis ir baigiasi savaimiu pasveikimu ir viruso eliminacija. Tokiu būdu, teigiamas rezultatas, gautas atliekant laboratorinį ŽPV DNR tyrimą, neleidžia daugeliu atvejų prognozuoti gimdos kaklelio vėžio išsivystymo.

Pastaraisiais metais papilomavirusinės infekcijos mechanizmų tyrimai parodė, kad infekciniame procese išskiriamos dvi stadijos: 1 – viruso reprodukcinio dauginimosi stadija ir 2 – integracinės infekcijos stadija, kurios metu viruso DNR įsiterpia (integruojasi) į infekuotų ląstelių genomą.

Pirmoji stadija yra grįžtama, ir daugelis infekuotų asmenų patiria spontanine remisiją. Integracinės infekcijos stadija – tai pirmas žingsnis ląstelės navikinės transformacijos link ir labai dažnai baigiasi karcinomos išsivystymu (R.W. Tinkle "Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer". Nature reviews, 2002, v.2, pp1-7).

Neseniai išaiškinta, kad ŽPV DNR integraciją į ląstelės genomą lydi aktyvi viruso onkobaltymų gamyba, tarp jų ir baltymo E7. Baltymo E7 buvimas gimdos kaklelio mėginiuose

mūsų teigimu laikomas vienareikšmiu liudijimu apie epitelio ląstelių, turinčių integruotą ŽPV genomo kopiją, prasidėjusią malignizaciją. Šis teiginys dera su rezultatais, pateiktais Patente WO0154713 Method for determining risk of developing cervical cancer. Autoriai nustatinėjo onkobaltymų E6 ir E7 kiekį gimdos kaklelio mėginiuose, tam tikslui naudodami imunohistochemijos metodą, kuris ženkliai nusileidžia mūsų pritaikytam imunofermentinės analizės metodui.

Išradimo tikslas – panaudojus imunofermentinės analizės metodą, nustatyti ankstyvą navikinę ŽPV virusų vystymosi kryptį, skirti savalaikį gydymą, apsaugantį nuo onkologinės ligos išsivystymo.

Tikslas pasiekiamas tuo, kad gimdos kaklelio displazijų ir vėžio, susijusių su žmogaus papilomos virusais (ŽPV), ankstyvos diagnostikos in vitro būdu atlieka ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 kiekio nustatymą, panaudojant du tipus-porą fermentu pažymėtų monokloninių antikūnų, atpažįstančių skirtingus ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 antigeninius determinantus, koreliuoja ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymą E7 kaip epitelinių ląstelių navikinės transformacijos biocheminį žymenį (markerį) ir, esant ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 40 pg/ml -50 ng/ml skaitinei reikšmei, liudija gimdos kaklelio displazijų ir vėžio vystymosi užuomazgą.

Monokloninių antikūnų porą sudaro fermentu pažymėti monokloniniai antikūnai 716-281 ir 716-332.

Naudoja fermentu pažymėtų monokloninių antikūnų perteklių, didinančiu ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 aptikimo intervalą 40 pg/ml - 50 ng/ml.

1 pavyzdys

Rekombinantinių plazmidžių, koduojančių ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 sintezę, sudarymas

Geno E7 šaltiniu panaudota gimdos kaklelio biopsinė medžiaga, paimta iš ligonių, kurioms diagnozuota gimdos kaklelio displazija. Panaudojant polimerazės grandininę reakciją (PGR), paimti klinikiniai mėginiai ištirti ŽPV infekcijos buvimo atžvilgiu. Atrinkti mėginiai, kuriuose nustatyta ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų DNR, po to, panaudojant genospecifinius pradmenis, PGR metodu amplifikuoti ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų genai E7 (303 bp DNR fragmentas – ŽPV-16 ir 324 bp fragmentas – ŽPV-18) ir klonuoti plazmidėje pBluescript SK(+) (Stratagene) įterpiant EcoRI-BamHI kirpimo vietose. Klonuotų genų oligonukleotidinių sekų nustatymas parodė visišką atitikimą GenBank duomenims (pavyzdžiui, AF125673).

Sekančiame darbo etape geno struktūrinės dalies 3' galo srityje buvo įjungtos transliacijos terminacijos sekos.

Fig. 2 pateikta gauto genetinio darinio plazmidės sandara.

Fig. 3 parodyta ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų baltymo E7 sintezė *E. coli* ląstelėse

pHE716 koduoja hibridinį baltymą **e716**: Met(His)6-GluPheIle-E716-GlySer (111 a.l., 12,5 kDa, IET 4,6). Būtina pažymėti, kad šis baltymas elektroforezės metu SDS-PAAG pagal Lemli pasižymi anomaliniu judrumu (apie 21 kDa) ir tai atitinka literatūros duomenis.

pHE718 koduoja hibridinį baltymą **e718**: Met(His)6-GluPheSer-E718-GlySer (117 a.l., 13,5 kDa, IET 5,4).

Gautų genų ekspresijai panaudotas kamienas BL21 (DE3). Indukciją ir ląstelių suardymą atlikome pagal standartinę schemą. Po suardymo e716 ir e718 randami tirpių ląstelės baltymų frakcijoje, todėl chromatografiją Ni-IIIa-agarozėje atlikome natyviose sąlygose nepridėjus šlapalo.

2 pavyzdys

Pelių monokloninių antikūnų ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų rekombinantiniams baltymams E7 gavimas

Balb/c linijos pelės (patelės, 16-18 g) buvo dukart imunizuotos (intervalas dvi savaitės), suleidžiant į letenėlių pagalvėles išgrynintus ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų baltymo E7 preparatus, gautus iš rekombinantinių *E.coli* lizatų panaudojus vienastadijinės metalochelatinės chromatografijos metodą. Vienai imunizacijai panaudota 20 mkg baltymo suspensijos pavidalu leidžiant drauge su tokiu pat tūrio kiekiu pilno (1-a imunizacija) arba nepilno (2-a imunizacija) Freundo adjutanto.

Limfocitai paimti iš pakinklinių limfmazgių ketvirtą dieną po antros imunizacijos, panaudojus PEG 4000, buvo sulieti su mielomos ląstelėmis Sp 2/0 –Ag14, hibridomos atrinktos selektyvine terpe HAT, o po to atliktas skyringas netiesioginės IFA būdu ir teigiamos kultūros dukart klonuotos ribinių skiedimų būdu.

Atliekant IFA, 2 mkg/ml koncentracijos tirpale esantys ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų rekombinantiniai baltymai E7 sorbcijos būdu buvo prikabinėti (imobilizuoti) prie polistireno plokštelių, po to ant jų 1 val. prie 37°C temperatūros inkubacijai buvo užlieti neskiesti kultūrų supernatantai. Susijungę su imobilizuotu antigenu, monokloniniai antikūnai aptikti inkubuoiant 1 val. prie 37°C temperatūros su konjuguotais su peroksidaze ožkos antikūnais pelės IgG (H+L).

Substratu naudotas TMB tirpalas su vandenilio peroksidu. Optinis tankis matuotas prie 450 nm. Darbo eigoje ŽPV 16 tipo baltymui E7 gautos dvi hibridomų grupės: 716-281, 716-288 (IgG2b) ir 716-321, 716-325, 716-332, 716-343 (IgG2a), kurios, atliekant netiesioginę IFA, vienodai gerai reagavo su ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų baltymu E7.

1 lentelėje pateikti optinio tankio rodikliai, gauti matuojant prie 450 nm netiesioginės IFA būdu titruojant monokloninius antikūnus sąveikoje su imobilizuotais ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų baltymu E7.

3 pavyzdys

Imunofermentinės analizės, skirtos kiekybiniam ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymo E7 nustatymui monokloninių antikūnų (MoAk) pagrindu, atlikimo sąlygų optimizacija

Monokloniniai antikūnai ŽPV 16 tipo baltymui E7 buvo išskirti iš ascitinių skysčių afininės chromatografijos būdu baltymo G sefarozėje (grynumas daugiau 95%) ir pažymėti naudojant perjodato metodą.

“Sendvič” (“sumuštinio”)-IFA būdu poromis patikrintas visų MoAk derinių (kombinacijų) gebėjimas kiekybiškai nustatyti ŽPV 16 tipo baltymą E7. Tam tikslui kiekvienos rūšies MoAk buvo imobilizuoti polistireno plokštelėse, po to pridėti ŽPV 16 tipo baltymo E7 septyni dukartiniai skiedimai (koncentracijų diapazonas 0,039-5,0 ng/ml), susidarę imuniniai kompleksai aptikti panaudojant visus MoAk peroksidazinius konjugatus ir TMB kaip substratą.

Paaiškėjo, kad visos patikrintos MoAk poros pasižymi gebėjimu sudaryti trigubą kompleksą (“sumuštinį”): imobilizuotas antikūnas-E7-konjugatas, kas ir rodo, kad išvalytas ŽPV16 tipo baltymas E7 tirpale yra oligomero būklėje netgi esant koncentracijų diapazonui 10^{-12} – 10^{-9} M.

Nežiūrint to, kad visi MoAk deriniai buvo veiklūs naudojant “sendvič”-IFA metodą, poros, kurias sudarė tie patys antikūnai arba tai pačiai grupei priklausančios antikūnai, pasižymėjo mažesniu jautrumu (pagal optinio tankio rodiklį, esant fiksuotai ŽPV 16 tipo baltymo E7 koncentracijai, ir pagal kalibracinio grafiko kreivę), negu MoAk poros, sudarytos iš skirtingoms grupėms priklausančių antikūnų.

Pagal jautrumą ir fono nebuvimą geriausi rezultatai pasiekti plokštelių sensibilizacijai naudojant **MoAk 716-281**, o peroksidaziniam konjugatui – **MoAk 716-332**.

ŽPV 16 tipo baltymo E7 kiekybinės analizės, panaudojant šią MoAk porą, atlikimo sąlygos buvo optimizuotos kaitaliojant antikūnų, naudotų sorbcijai, koncentracijas, konjugato skiedimus, buferinių tirpalų sudėtį, visų “sendvič”-IFA stadijų laiką ir temperatūrą.

Fig. 4 pateikiamas ŽPV 16 tipo baltymo E7 kiekybinio nustatymo “sendvič”-IFA būdu kalibracinis grafikas.

0.1 M karbonatiniame buferiniame tirpale esantys MoAk 716-288 (pH 9.6, koncentracija 5 mkg/ml) imobilizuoti sorbcijos būdu. MoAk 716-332 konjugato su peroksidaze darbinis skiedimas – 1/50000 PBS tirpale su 0,2% BSA ir 0.05 % Tween 20. Substratas TMB.

Abscisės ašyje – baltymo koncentracija, ng/ml. Ordinatės ašyje – optinis tankis prie 450 nm.

Grafike nurodyta bandymo paklaida skaičiuojant trims nepriklausomiems matavimams.

Kaip matyti iš paveikslo, kalibracinis grafikas antigeno koncentracijos diapazone 0,039-5,0 ng/ml praktiškai yra linijinis, pasižymi fono nebuvimu ir pasiekia ŽPV16 tipo baltymo E7 detekcijos ribą esant pastarojo koncentracijai – 40 pg/ml, o tai yra reikšminga aplinkybė, siekiant nustatyti ŽPV16 tipo onkobaltymą E7 ekspresijos lygį transfekuotose ląstelėse ir klinikiniuose mėginiuose.

4 pavyzdys

ŽPV 16 tipo onkobaltymo E7 kiekio nustatymas gimdos kaklelio mėginiuose

Gimdos kaklelio nuograndų medžiagą talpino 1 ml fiziologinio tirpalo, tris kartus užšaldė-atitirpino ir centrifugavo mikrocentrifugoje (Eppendorf) 10 min., 10 000 aps./min. Gautą supernatantą skiedė du kartus PBS-AT (PBS, 0,2% BSA, 0,1 % Tween), po to 200 mkl šio skiedinio įliejo į plokštelės šulinėlį, prieš tai padengtą sorbcijos būdu imobilizuotais monokloniniais antikūnais baltymui E7, ir pernešdami po ½ kiekio titravo į sekančius 4 šulinėlius.

Toje pačioje plokštelėje kaip standartą titravo išvalytą rekombinantinį ŽPV 16 tipo onkobaltymą E7 nuo 4 ng/ml iki 0,062 ng/ml. Po 1 val. inkubacijos ir plovimo į šulinėlius liejo peroksidaze pažymėtą monokloninių antikūnų ŽPV 16 tipo onkobaltymui E7 konjugatą, inkubavo 1 val. ir reakciją išryškino pridėdami TMB. Optinį tankį matavo multiskanu prie 450 nm ilgio bangos.

Pagal standarto skiedimų optinį tankį sudarė kalibracinį grafiką, pagal kurį nustatė ŽPV 16 tipo onkobaltymo E7 koncentraciją mėginyje. Kontrole tarnavo gimdos kaklelio mėginiai, paimti iš 28 sveikų moterų. Visais šiais atvejais ŽPV 16 tipo onkobaltymo E7 testas buvo neigiamas.

ŽPV 16 tipo onkobaltymo E7 nustatymas gimdos kaklelio mėginiuose pateiktas **2 lentelėje**.

Dvigubo antikūnų “sendvičo” (“sumuštinio”) metodas, pagrįstas fermentu pažymėtu monokloninių antikūnų 716-281 ir 716-332 panaudojimu kiekybiniam ŽPV 16 tipo onkobaltymo E7 nustatymui klinikinėje medžiagoje, palyginus su kitais imunodiagnostikos metodais, tokiais

kaip imunohistochemija, Western blotingas, tėkmės citofluorimetrija ir kt., pasižymi eile neginčytinų privalumų:

1. Dideliu specifiškumu ir fono nebuvimu dėka vienu metu vykstančio dviejų monokloninių antikūnų susirišimo su tikslinio ŽPV 16 tipo antigeno E7 skirtingais epitopais.
2. Dideliu jautrumu (aptikimo riba 40 pg/ml) dėka to, kad panaudojamas didelis fermentu pažymėtų monokloninių antikūnų perteklius ir šiuolaikiniai chromogeniniai substratai, pavyzdžiui, TMB.
3. Ištestu dinaminio diapazonu nuo 40 pg/ml iki 50 ng/ml, leidžiančiu kiekybiškai išmatuoti ŽPV 16 tipo onkobaltymo E7 koncentraciją naudojant minimalų mėginio skiedimo skaičių.
4. Nesudėtinga mėginio paruošimo procedūra, nereikalaujanti bandinio fiksacijos ir plovimų.
5. Galimybe vienu metu nustatyti ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobaltymą E7 dėka to, kad monokloniniai antikūnai kryžminiai reaguoja su abiem baltymais.
6. Didelio mėginių kiekio skyringo ir individualaus ligonio gydymo efektyvumo monitoringo galimybe dėka to, kad mėginių paėmimas ir analizė pasižymi aukštu standartiškumu.

1 lentelė

Optinio tankio rodikliai, gauti matuojant prie 450 nm netiesioginės IFA būdu titruojant monokloninius antikūnus sąveikoje su imobilizuotu ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų baltymu E7

MoAk konc. ng/ml	ŽPV 16 tipo onkobaltymo E7 sorbcija						ŽPV 18 tipo onkobaltymo E7 sorbcija					
	716-281	716-288	716-321	716-325	716-332	716-343	716-281	716-288	716-321	716-325	716-332	716-343
100	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
30	1.777	1.515	1.382	1.131	1.393	1.737	1.807	1.709	>2	>2	>2	>2
10	0.947	0.705	0.462	0.375	0.473	0.652	1.010	0.939	1.331	1.194	1.350	1.672
3	0.398	0.301	0.160	0.117	0.168	0.265	0.445	0.412	0.508	0.425	0.526	0.839
1	0.154	0.091	0.047	0.030	0.045	0.003	0.176	0.170	0.176	0.145	0.190	0.365
0	0.017	0.007	0.013	-0.008	-0.012	0.0	0.029	0.026	0.021	0.020	0.025	0.028

2 lentelė

ŽPV 16 tipo onkobaltymo E7 nustatymas gimdos kaklelio mėginiuose

Ligonės Nr.	Anti E7 IgG	E7-16	Bendras baltymas OT 1/20	Mėginio infekcijos patvirtinimas	Diagnozė
P1	0.678 0.418	0.1 ng/ml	0.084	ŽPV 16, 18	CIN III
P2	0.466 0.317	2.2 ng/ml	0.151	ŽPV 31	CIN I-II
P3	0.232 0.127	0.8 ng/ml	0.152	ŽPV didelės onkogeninės rizikos	CIN II-III
P4	0.337 0.158	3.5 ng/ml	0.228		CIN III, įtariamas gimdos kaklelio vėžys
P5	0.268	10 ng/ml	0.041	ŽPV 16, 18	CIN III, įtariamas gimdos kaklelio vėžys
P6	0.422 0.202	1 ng/ml	0.058	ŽPV 16, 18	CIN II
P7	0.215	0.06 ng/ml	0.174	ŽPV 16, 18	CIN II-III
P8	0.357 0.164	0,3 ng/ml	0.089	ŽPV 16	CIN I-II
P9	0.412 0.197	1,6 ng/ml	0.096	ŽPV 18	CIN II-III
P10	0.335 0.130	0,9 ng/ml	0.165	ŽPV 16	CIN III, įtariamas gimdos kaklelio vėžys
P11	0.280	1,2 ng/ml	0.180	ŽPV 16	CIN II
P12	0.554 0.233	0,8 ng/ml	0.220	ŽPV 16	CIN II-III
P13	0.443	0,8 ng/ml	0.097	ŽPV 16	CIN I-II
P14	0.214	1,8 ng/ml	0.162	ŽPV 16	CIN II

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Gimdos kaklelio displazijų ir vėžio, susijusių su žmogaus papilomos virusais (ŽPV), ankstyvos diagnostikos in vitro būdas, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad atlieka ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobalymo E7 kiekio nustatymą, panaudojant du tipus-porą fermentu pažymėtų monokloninių antikūnų, atpažįstančių skirtingus ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobalymo E7 antigeninius determinantus, koreliuoja ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobalymą E7 kaip epitelinių ląstelių navikinės transformacijos biocheminį žymenį (markerį) ir, esant ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobalymo E7 40 pg/ml -50 ng/ml skaitinei reikšmei, liudija gimdos kaklelio displazijų ir vėžio vystymosi užuomazgą.

2. Būdas pagal 1 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad monokloninių antikūnų porą sudaro fermentu pažymėti monokloniniai antikūnai 716-281 ir 716-332.

3. Būdas pagal 1 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad naudoja fermentu pažymėtų monokloninių antikūnų perteklių, didinančiu ŽPV 16 ir ŽPV 18 tipų onkobalymo E7 aptikimo intervalą 40 pg/ml - 50 ng/ml.

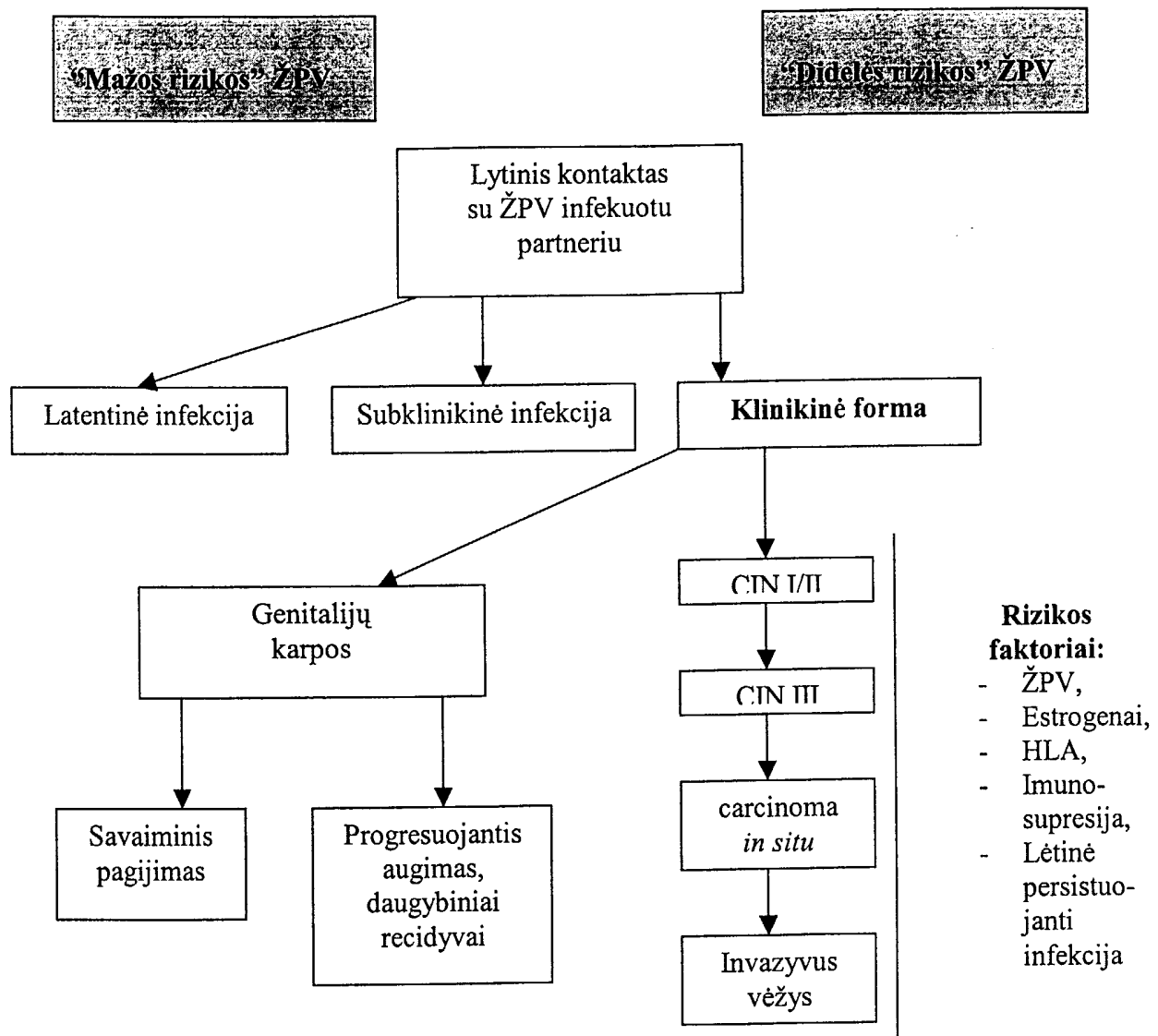


Fig. 1

T7 promotorius
 →
 TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACT
 TTAAGAAGGAGATATACATATGcatcaccatcaccatcacGAATTC - E7 gene HPV16(18) - GGATCC
 rbs *Nde I* His-Tag *EcoRI* *BamHI*
TAATTAGCTGAAAGCTT
 Term *HinDIII*

Fig. 2

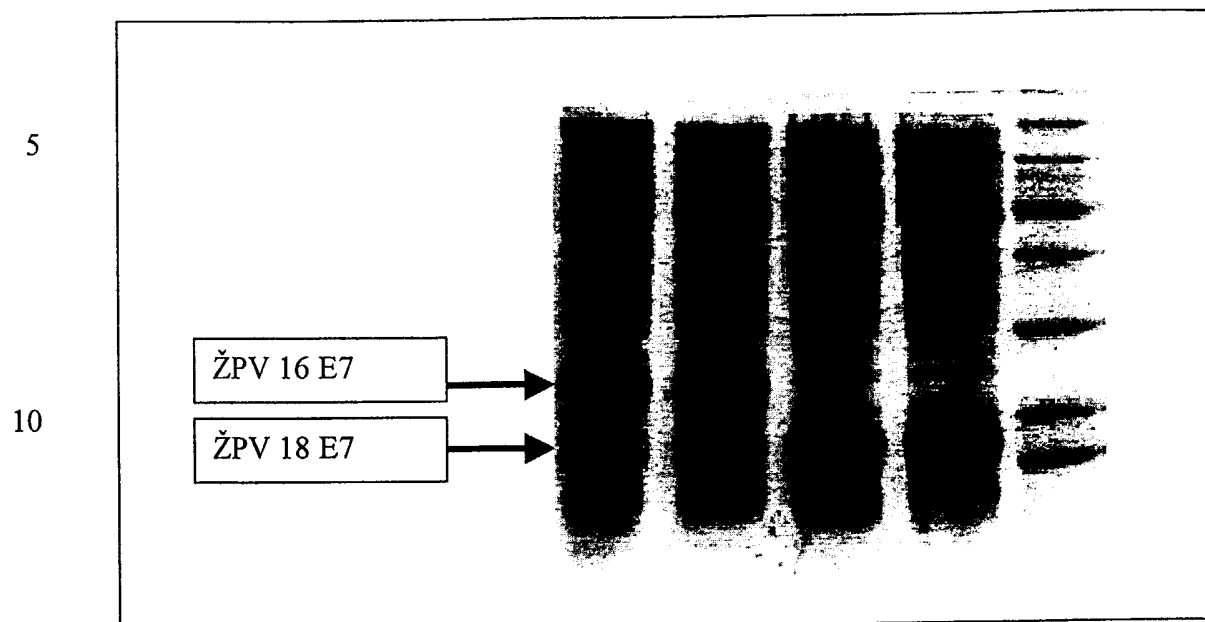


Fig. 3

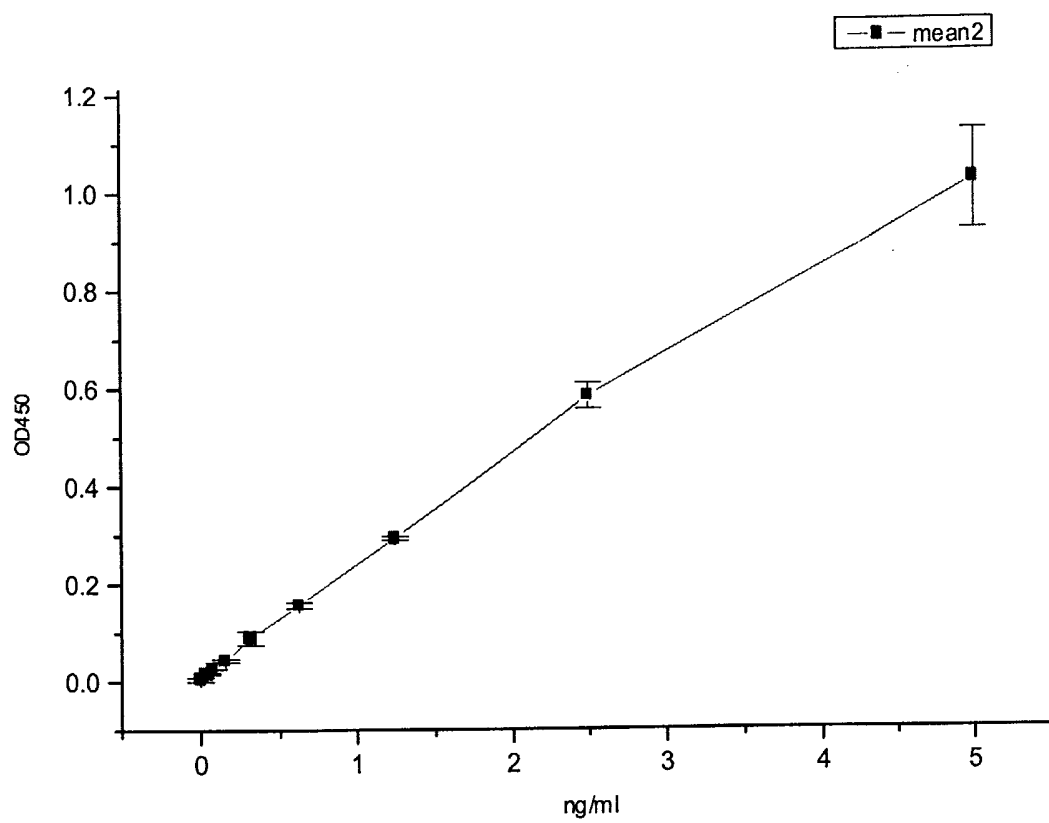


Fig. 4