PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1995 - 6

(22) Přihlášeno: 02.07.1993

(30) Právo přednosti:
07.07.1992 US 1992/910759

(40) Zveřejněno: 13.03.1996
(Věstník č. 3/1996)

(47) Uděleno: 24.04.2003

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 18.06.2003
(Věstník č. 6/2003)

(86) PCT číslo: PCT/US93/06309

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 94/001778

(11) Číslo dokumentu:
291 951

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[7]:
G 01 N 33/576

(73) Majitel patentu:
CHIRON CORPORATION, Emeryville, CA, US;

(72) Původce vynálezu:
Chien David Y., Alamo, CA, US;

(74) Zástupce:
Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

Způsob detekce časné sérokonverze, způsob detekce protilátek HCV a kit k použití při těchto způsobech

(57) Anotace:

Způsob detekce časné sérokonverze u savčích hostitelů s virem hepatitidy C, HCV zahrnuje kroky: (a) získá se od hostitele tělesná složka, u níž je podezření, že obsahuje protilátky na HCV, (b) tato tělesná složka se uvádí do styku s HCV antigenem a se standardní kontrolou za podmínek umožňujících imunologickou reakci a (c) stanoví se přítomnost imunitních komplexů těchto protilátek a tohoto antigenu, přičemž nepřítomnost těchto imunitních komplexů standardní kontroly a přítomnost imunitních komplexů obsahujících HCV antigen indikuje sérokonverzi na HCV. HCV antigen se volí z antigen obsahujícího konformačního epitopu zakódovaného v doméně E1 HCV genomu, v doméně E2 oblasti HCV genomu nebo jejich agregátů a čistí se za podmínek, při nichž nedochází k denaturaci. Kit obsahuje antigen HCV a kontrolní standardy, balené ve vhodných ampulkách, a instrukce pro použití kitu.

CZ 291951 B6

Způsob detekce časné sérokonverze, způsob detekce protilátek HCV a kit k použití při těchto způsobech

Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobu detekce časné sérokonverze, způsobu detekce protilátek viru hepatitidy typu C (HCV) a kitu k použití při těchto způsobech.

Dosavadní stav techniky

HCV poprvé identifikoval a charakterizoval jako prvotní příčinu posttransfuzní ne–A a ne–B hepatitidy (NANBH) Houghton a kol. Vedle toho, že poskytl podstatné informace týkající se HCV, Houghton a jeho společníci a také jejich spolupracovníci nalezli řadu obecných a specifických imunologických reagencií a metod, viz například Houghton a kol., zveřejněná EP přihláška číslo 318 216, Houghton a kol., zveřejněná EP přihláška číslo 388 232; dále též Choo a kol., Science 244, 359 až 362 (1989); Kuo a kol., Science 244, 362 až 364 (1989); Takeuchi a kol., J. Gen. Virol. 71, 3 027 až 3 033 (1990); Takeuchi a kol., gene 91, 287 až 291 (1990); Takeuchi a kol., Nucl. Acids Res. 18, 4 626 (1990); Miyamura a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 983 až 987 (1990); Saito a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6 547 až 6 549 (1990); Choo a kol., Proc. Acad. Sci. USA 88, 2 451 až 2 455 (1991); Han a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1 711 až 1 715; Houghton a kol., Hepatology 14, 381 až 388 (1992); Weiner a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3 468 až 3 472 (1992). Tyto publikace vytvářejí rozsáhlý základ stavu techniky o HCV obecně, stejně jako informují o výrobě a použití HCV peptidových imunologických reagencií. Pro stručnost se zde údaje z těchto publikací toliko uvádějí jako odkaz.

Práce Houghtona a kol. Pohotově aplikovali a rozšířili další badatelé. Viz například highfield a kol., britská zveřejněná přihláška vynálezu číslo 2 239 245 (The Welcome Foundation Ltd.); Wang publikovaná přihláška vynálezu EP číslo 442 394) United Biomedical Inc.); Leung a kol. Publikovaná přihláška vynálezu EP číslo 445 423 (Abbott Laboratories); Habit a kol. Publikovaná přihláška vynálezu EP číslo 451 891 (Akzo N.V.); Reyes a kol., PCT publ. Číslo WO 91/15 516 (Genelabs Inc.); Maki a kol., publikovaná přihláška vynálezu EP číslo 468 657 (Tonen Corp.); a Kamada a kol., publikovaná přihláška vynálezu EP číslo 469 348 (Shionogi Seiyaku K.K.). Viz též Matsuura a kol., (1992) J. Virology 66, str. 1425; kato a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, str. 9524 až 9528; Takamizawa a kol., J. Virol. (1991) 65, str. 1105 až 1113; Chiba a kol. Proc. Natl. Acad. Csi. USA (1991) 88, str. 4641 až 4645; Harada a kol., J. Virol. (1991) 65, str. 3015 až 3021; Hijikata a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991), 88, str. 5547 až 5551; Okamoto a kol., Jpn. J. Exp. Med. (1990) 60, str. 167 až 177; Yuasa a kol., J. Gen. Virol. (1991) 72, str. 2021 až 2024; Watanabe a kol., Int. J. Cancer (1991) 48, str. 340 až 343.

Citlivé, specifické metody ke skrínování a identifikování nosičů HCV a HCV kontaminované krve nebo krevních derivátů jsou významným pokrokem v lékařství.posttransfuzní žloutenka (posttransfusion hepatitis PTH) se vyskytuje u 10 % pacientů po transfuzi a na HCV z toho připadá 90 % těchto případů. Hlavním problémem u tohoto onemocnění je častý výskyt chronického poškození jater (25 až 55 %) oproti jiným žloutenkám, například typu B.

Péče o pacienty stejně jako prevence přenosu HCV krví a krevními deriváty nebo těsným osobním stykem vyžaduje spolehlivou diagnostiku a prognostické nástroje, jako jsou HCV polypeptidy, k detekci protilátek týkajících se HCV. Takové polypeptidy jsou užitečné také jako vakcíny a imunoterapeutická činidla k prevenci a/nebo k léčení nemoci. Jelikož HCV je poměrně krátce znám, existuje trvalá potřeba definovat další imunologická činidla, která umožní studovat dále klinický průběh onemocnění a epidemiologii HCV v populaci.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je způsob detekce časné sérokonverze u savčích hostitelů s virem hepatitidy C, HCV, který zahrnuje tyto kroky:

a) získá se od hostitele tělesná složka, u níž je podezření, že obsahuje protilátky na HCV,

b) tato tělesná složka se uvádí do styku s HCV antigenem a se standardní kontrolou za podmínek umožňujících imunologickou reakci a

c) stanoví se přítomnost imunitních komplexů těchto protilátek a tohoto antigenu, přičemž nepřítomnost těchto imunitních komplexů obsahujících standardní kontrolu a přítomnost imunitních komplexů obsahujících HCV antigen indikuje sérokonverzi na HCV,

jehož podstata spočívá v tom, že HCV antigen se volí z antigen obsahujícího konformačního epitopu zakódovaného v E1 oblasti HCV genomu, E2 oblasti HCV genomu a jejich agregátů a čistí se za podmínek, při nichž nedochází k denaturaci.

Jedním z výhodných provedení tohoto vynálezu je způsob detekce protilátek HCV u savčích hostitelů, který zahrnuje tyto kroky:

a) odebírá se od hostitele tělesná složka, u níž je podezření, že obsahuje protilátky na HCV,

b) tato tělesná složka se uvádí do styku s alespoň dvěma antigeny HCV za podmínek umožňujících imunologickou reakci a

c) stanoví se přítomnost imunitních komplexů tohoto antigenu a těchto protilátek,

jehož podstata spočívá v tom, že imunitní komplexy se detekují v časné sérokonverzi a alespoň jeden z HCV antigenů se volí ze souboru zahrnujícího HCV antigen obsahující konformační epitop zakódovaný v E1 oblasti HCV genomu, antigen obsahující konformační epitop zakódovaný v E2 oblasti HCV genomu a jejich agregátů a čistí se za podmínek, při nichž nedochází k denaturaci.

Předmětem tohoto vynálezu je také kit (neboli souprava k detekci)pro použití při způsobu uvedeném výše, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje antigen HCV a kontrolní standardy, balené ve vhodných ampulkách a instrukce pro použití tohoto kitu.

Vynález blíže objasňuje následující popis a připojené obrázky:

Na obr. 1 jsou schematicky naznačeny předpokládané domény HCV polyproteinu.

Na obr. 2 je schéma ukazující některé význaky vektoru pSC59.

Obr. 3A, 3B a 3C ukazují procento pacientů skupiny I, II a III reaktivních ve zkouškách ELISA na individuální antigeny HCV.

„HCV antigen" je polypeptid nebo polypeptidový analog (například mimitopy) obsahující aminokyselinovou sekvenci (a/nebo aminokyselinový analog) definující nejméně jeden epitop HCV.zpravidla odpovídají sekvence definující epitop aminokyselinové sekvenci proteinu HCV (buď identicky nebo substitucí analogů nativního aminokyselinového zbytku, který nerozrušuje epitop). Obecně bude mít sekvence, definující epitop, délku 5 nebo více aminokyselin, zpravidla 8 a s výhodou 10 nebo více aminokyselin. Vzhledem ke konformačním epitopům může být délka sekvence definující epitop podrobena širokým obměnám, neboť se má zato, že tyto epitopy jsou

tvořeny antigenem trojrozměrného tvaru (například záhyby „folding"). Tudíž aminokyselin definujících epitop může být co do počtu málo, avšak mohou být široce rozptýleny podél délky molekuly (nebo dokonce na různých molekulách v případě dimerů, atd.), uváděné do správné epitopové konformace cestou záhybování (folding). Části antigenu mezi zbytky, definujícími epitop, nemusejí být rozhodující pro konformační strukturu epitopu. Například vypuštění nebo substituce těchto intervenujících sekvencí nemusí ovlivnit konformační epitop za předpokladu, že se uchovají sekvence rozhodné pro epitopovou konformaci (například cysteiny zahrnuté v disulfidové vazbě, glykosylační místa, atd.).

Antigeny HCV podle tohoto vynálezu tvoří konformační epitopy z domén (obalových) E1 a/nebo E2 HCV. Doména E1, o které se má zato, že odpovídá virálnímu obalu proteinu, je běžně považována za spojující aminokyseliny 192–383 polyproteinu HCV (zveřejněná přihláška vynálezu PCT číslo WO 91/15 771, obr. 1). Podle exprese v systému CHO (glykosilovaném) se má zato, že má přibližnou molekulovou hmotnost 35 kD zjišťovanou způsobem SDS–PAGE. O proteinu E2, dříve nazývaném NS1, se má zato, že spojuje aminokyseliny 384–800 polyproteinu, a že je také obalovým proteinem. Podle exprese v systému CHO (glykosilovaném) se má zato, že má zdánlivou gelovou molekulovou hmotnost přibližně 72 kD. Je jasné, že tyto proteinové koncové body jsou aproximativní (například karboxy zakončení E2 by mohlo ležet v oblasti aminokyselin 750–820). Je také zřejmé, že prototypová sekvence izolátu HCV1 ve zmíněné zveřejněné přihlášce vynálezu PCT je citována pouze pro ilustraci, a že jakýkoli izolát HCV (viz například odkazy citované v dosavadním stavu techniky) je vhodným zdrojem sekvence E1 a/nebo E2 pro provádění způsobu podle vynálezu.

Antigeny E1 a E2, použité podle vynálezu, mohou být virální proteiny s plnou délkou, v podstatě jejich verze s plnou délkou, nebo jejich funkční fragmenty (například fragmenty nepostrádající sekvence nutné k formování nebo uchování konformačního epitopu). Nadto mohou antigeny HCV podle vynálezu také jiné sekvence, které obklopují nebo nebrání vytvoření sledovaného konformačního epitopu.přítomnost nebo nepřítomnost konformačního epitopu lze snadno zjistit skrínováním sledovaného antigenu s protilátkou (polyklonální sérum nebo monoklonální vůči konformačnímu epitopu) a porovnáním reaktivity s reaktivitou denaturované verze antigenu, který zadržuje jen případné lineární epitopy. Při takovém skrínování za použití polyklonálních protilátek může být výhodné absorbovat polyklonální sérum napřed s denaturovaným antigenem a zjistit, zda zachycuje protilátky pro sledovaný antigen.

Antigeny HCV podle vynálezu lze připravit obvyklým způsobem, který poskytne sledovaný konformační epitop. Například výhodným způsobem k zajištění sekretovaných glykosilovaných antigenů E1 a/nebo E2 v „nativní" konformaci je rekombinantní exprese savčích nebo hmyzích buněk. Může však být možné, jak je to známo u proteinů, podrobit antigeny v jiném rekombinantním hostiteli a renaturovat protein po jeho získání.je také zřejmé, že chemická syntéza může také poskytnout konformační antigenové mimitopy, které proreagují s „nativním" konformačním epitopem antigenu.

Výhodnými antigeny jsou také komplexy E1 a/nebo E2 (nazývané též agregáty) obsahující více než jeden monomer E1 nebo E2. Dimery E1 : E1, dimery E2 : E2 a heterodimery E1 : E2 jsou také antigeny v rozsahu tohoto vynálezu. Agregáty mohou též zahrnovat větší útvary a mohou mít molekulové hmotnosti přesahující 800 kD.

Pojem „spojený polypeptid" (fusion polypeptide) určuje polypeptid, v němž je alespoň jeden antigen HCV součástí jediného souvislého řetězce aminokyselin, přičemž se takový řetězec v přírodě nevyskytuje. Antigeny HCV mohou být navzájem spojeny přímo peptidovými vazbami, nebo mohou být odděleny vložením sekvencí aminokyselin. Spojené polypeptidy mohou obsahovat také sekvence aminokyselin exogenní vůči HCV.

Pojem „společná pevná matrice“ (common solid matrix) určuje pevnou látku, ke které jsou vázány individuální antigeny HCV nebo spojené polypeptidy kovalentními nebo nekovalentními vazbami, jako je hydrofobní adsorpce.

Pojem „tělesná složka“ (body component) znamená kapalinu nebo tkáň savčího jedince (například antropoidního, lidského) která obvykle obsahuje protilátky jedincem vytvořené. Takové tělesné složky jsou v oboru známé a zahrnují příkladně krev, plazmu, sérum, míšní mok, lymfatické šťávy, sekrety dýchacího traktu nebo urogenitálního traktu, slzy, sliny, mléko, bílé krvinky a kostní dřeň.tělesné složky zahrnují biologické tekutiny. Pojem „biological liquid“ (biologická tekutina) se týká tekutiny získané z organizmu. Některých biologických tekutin se používá jako zdroje jiných produktů, jako jsou například faktory srážlivosti (například faktor VIII : C), sérový albumin a růstový hormon. V takových případech je důležité, aby zdroj biologické tekutiny byl prost znečištění virem, jako je HCV.

Pojem „imunologicky reaktivní“ (immunologically reactive) znamená, že sledovaný antigen bude reagovat specificky a anti–HCV protilátkami přítomnými v tělesné složce jedince infikovaného HCV.

Pojem „imunitní komplex“ (immune complex) určuje kombinaci vytvořenou, když protilátka se váže na epitop na antigenu.

Zde používaný pojem „E1“ znamená protein nebo polypeptid podrobený expresi mezi prvními 400 aminokyselinami polyproteinu HCV, o němž se někdy hovoří jako E–proteinu nebo S–proteinu. V jeho přírodním tvaru je to 35 kD glykoprotein. Ve většině kmenů HCV je protein E1 zakódován ve virálním polyproteinu následně za C (jádrovým) proteinem. Protein E1 zasahuje od přibližně aminokyseliny (aa) 192 do přibližně aa 383 plné délky polyproteinu. Zde používaný pojem „E1“ zahrnuje také analogy a zkomolené tvary, které jsou imunologicky křížově reaktivní s přírodním E1.

Zde používaný pojem „E2“ znamená protein nebo polypeptid podrobený expresi mezi prvními 900 aminokyselinami polyproteinu HCV, o němž se někdy hovoří jako o NS1–proteinu.v jeho přírodním tvaru je to 72 kD glykoprotein.ve většině kmenů HCV je protein E2 zakódován ve virálním polyproteinu následně za protein E1. Protein E2 zasahuje od přibližně aminokyseliny aa 384 do přibližně aa 820. Zde používaný pojem „E2“ zahrnuje také analogy a zkomolené tvary, které jsou imunologicky křížově reaktivní s přírodním E2.

Zde používaný pojem „agregát“ (agregate) znamená komplex E1 a/nebo E2 obsahující více než jeden monomer E1 nebo E2. Dimery E1 : E1, dimery E2 : E2 a heterodimery E1 : E2 jsou „agregáty“ v rozsahu této definice.agregáty mohou také zahrnovat větší útvary a mohou mít molekulové hmotnosti větší než 800 kD.

Pojem „vyčištěný“ (purified) v souvislosti s proteinem se týká kompozic, kde žádaný protein tvoří nejméně 35 % celkové proteinové složky v kompozici. Žádaný protein činí s výhodou nejméně 40 %, výhodněji nejméně přibližně 50 %, ještě výhodněji nejméně přibližně 60 %, ještě výhodněji nejméně přibližně 70 %, ještě výhodněji nejméně přibližně 80 %, ještě výhodněji nejméně přibližně 90 % a nejvýhodněji přibližně 95 % hmotnosti celkové proteinové složky. Kompozice může obsahovat jiné složky, jako jsou například uhlohydráty, soli, lipidy a rozpouštědla, aniž to ovlivní zde použité stanovení čistoty. Pojem „izolovaný“ protein znamená kompozici HCV, která má čistotu nejméně 35 %.

Pojem „izolovaný polypeptid“ znamená polypeptid, který byl v podstatě prost jiných virálních složek HCV, zejména genomického polynukleotidu HCV. Polypeptidová kompozice je „v podstatě prostá“ jiné složky, jestliže hmotnost polypeptidu v kompozici je nejméně 70 % polypeptidu a jiných kombinovaných složek, výhodněji nejméně přibližně 80 %, ještě výhodněji přibližně 90 % a nejvýhodněji 95 % nebo více procent.

Způsoby imunologických testů podle vynálezu používají antigenů HCV z domén E1 a E2 a těch, které obsahují konformační epitopy rozeznávané protilátkami v séru jedinců infikovaných HCV. Každý z antigenů má nejméně jeden konformační epitop, který existuje v přírodně se vyskytující částici HCV, nebo v jejím infekčním produktu, jak je zřejmo z imunoreaktivity antigenu s protilátkami v tělesné složce jedince infikovaného HCV a ze ztráty imunoreaktivity epitopu po denaturaci antigenu. Délka antigenu je postačující k udržení imunoreaktivního konformačního epitopu spojeného s tímto epitopem. V rozsahu vynálezu je také více než jeden konformační epitop na antigenu. Často mohou mít nativní obalové antigeny, použité v imunologických testech, plnou délku, mohou však být zkomolené, například ke zvýšení rozpustnosti nebo ke zlepšení sekrece (například vypuštěním domén spojujících membrány). Do rozsahu vynálezu také spadá použití buď jednotlivých antigenů nebo jejich kombinací či agregátů. Imunologické testy mohou tudíž použít epitopů E1, epitopů E2, agregátů nebo kombinací nativních E1 a E2. Podle záměru spadá také do rozsahu vynálezu používání antigenů s lineárními epitopy v kombinaci s obalovými konformačními epitopy HCV.

Způsoby detekce přítomnosti konformačních epitopů jsou v oboru známé a některé z nich jsou dále ilustrovány v příkladech.

Na základě předpokládaných aminokyselin, zakódovaných v nukleotidové sekvenci HCV1 a na základě jiných poznatků, jsou možnými proteinovými doménami zakódovaného proteinu HCV, stejně jako přibližná rozhraní tato:

Předpokládaná doména	Přibližné rozhraní (čísla aminokyselin)
C (nukleokapsidový protein)	1–191
E1 (virový obalový protein)	192–383
E2/NS1 (obal?)	384–800
NS2	800–1050
NS3 (proteáza?)	1050–1650
NS4	1651–2100
NS5 (polymeráza)	2100–3011 (zakončení).

Tyto domény jsou ovšem pokusné. Například rozhraní E1–NS2 je pravděpodobně v oblasti 750–810 a rozhraní NS3–NS4 je přibližně 1 640–1 650. Existuje také poznatek, že verze 191 aa C je prekurzor, který je dále veden (například do délky přibližně 170 aa), a že proteiny NS2, NS4 a NS5 jsou každý dále vedeny do dvou dokonalých proteinů. Vzájemná poloha domén je znázorněna na obr. 1.

Způsoby přípravy antigenů E1 a E2 včetně antigenů s nativními konformacemi jsou popsány v článku Spaete R a kol., Virology (1992) 188, str. 819–830 a v přihlášce vynálezu WO 92/08 734. Obecně se volí hostitelské buňky, jež umožní vytváření nativních konformačních epitopů v expresovaných obalových proteinech; těmito hostitelskými buňkami mohou být například zvířecí buňky, hmyzí buňky a kvasinkové buňky.

Mezi eukaryotické hostitele patří kultury kvasinkových a savčích buněk. Nejběžněji používanými kvasinkovými hostiteli jsou Saccharomyces cerevisiae a Saccharomyces carlsbergensis a jsou vhodnými plísňovými hostiteli. S kvasinkami kompatibilní vektory nesou značky, které umožňují výběr úspěšných transformantů udělujících prototropii auxotropickým mutantům nebo odolnost vůči těžkým kovům u kmenů divokého typu. S kvasinkami kompatibilní vektory mohou používat 2–mikronového počátku replikace (Broach a kol. (1983) Meth. Enz. 101, str. 307), kombinace CEN3 a ARS1 nebo jiných prostředků k zajištění replikace, jako jsou sekvence, které vedou k začlenění příslušného fragmentu do genomu hostitelské buňky. Řídicí sekvence pro kvasinkové vektory jsou v oboru známé a zahrnují promotory pro syntézu glykolitických enzymů (Hess a kol. (1968) J. Adv. Enzyme Reg 7, str. 149; Holland a kol. (1978) Biochemistry 17, str. 4 900), včetně promotoru pro3 fosfoglycerátovou kinázu (Hitzeman (180) J. Biol. Chem. 255, str. 2 073).

Začleněny mohou být i terminátory, jako například terminátory odvozené od enolazového genu (Holland (1981) J. Biol. Chem. 256, str. 1 385). Obzvlášť vhodnými řídicími systémy jsou systémy, které obsahují promotor glyceraldehyd–3 fosfátové dehydrogenázy (GAPDH) nebo řiditelný promotor alkoholové dehydrogenázy (ADH), terminátory také odvozené od GAPDH a je–li požadována sekrece, vedoucí sekvence z kvasinkového α–faktoru. Kromě toho oblast řídící transkripci a oblast iniciující transkripci, jež jsou funkčně spojeny mohou být takové, že přirozeně nesouvisejí s organismem divokého typu. Tyto systémy jsou podrobně popsány v přihláškách vynálezů EP 0 120 551, zveřejněné 3. října 1984, EP 0 116 201, zveřejněné 22. srpna 1984 a EP 0 164 556, zveřejněné 18. prosince 1985.

Řady savčích buněk, vhodných jako hostitelé, pro expresi jsou v oboru známé a zahrnují mnoho buněčných řad dostupných od American Type Culture Collection (ATCC), včetně Hela buněk, buněk z vaječníků čínských křečků (CHO), buněk z ledvin mladých křečků (BHK) a mnoho dalších řad savčích buněk. Vhodné promotory pro savčí buňky jsou také v oboru známé a zahrnují virové promotory, jako od Simian Virus 40 (SV40) (Fiers (1978) Nature 273, str. 113) Rous sarcomas virus (RSV), adenovirus (ADV) a hovězí nádorový virus (bovine papilloma virus –BPV). Savčí buňky mohou také vyžadovat terminátorové sekvence a sekvence poly A; mohou též být zahrnuty usnadňující sekvence zvyšující expresi a mohou být též žádoucí sekvence, které způsobují zesílení genu. Tyto sekvence jsou v oboru známé.

Vektory vhodné k replikaci savčích buněk jsou v oboru známé a mohou zahrnovat virální replikony, nebo sekvence zaručující integraci příslušných sekvencí kódujících epitopy NANBV do hostitelského genomu.

Vektor, kterého se používá k expresi cizích DNA, a kterého může být použito k přípravě vakcíny, je Vaccinia virus. V tomto případě je heterologní DNA začleněna do Vaccinia genomu. Technika začleňování cizí DNA do genomu vaccinia viru je v oboru známa a používá například homologové rekombinace. Heterologní DNA se obecně začleňuje do genu, který je se svou povahou zbytný, například thymidin kinázový gen (tk), který také zajišťuje selektovatelnou značku. Plazmidové vektory, které značnou měrou usnadňují konstrukci rekombinantních virů, jsou popsány v literatuře (viz například Mackett a kol., (1984) J. Virol. 49, str. 857; Chakrabarti a kol., (1985) Mol. Cell. Biol. 5, str. 3 403; Moss (1987 v knize Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (nakladatelé Miller a Calos, Cold Spring Harbor Laboratory, Gold Spring Harbor, N. Y.), str. 10). K expresi HCV polypeptidu pak dochází v buňkách nebo v jedincích, kteří byli imunizováni živým rekombinantním virem vakcíny.

Segment HCV CDNA kódující požadovanou sekvenci se začlení do Vaccinia vektoru. Sekvence, kódující polypeptid, může být připojena k vůdčí sekvenci. Vůdčí sekvencí může být sekvence pro aktivátor tkáňového plazminogenu (TPA) nebo z jiného zdroje, například sekvence pro ß–globin. Heterologový polynukleotid může být začleněn do vaccinia vektoru, který je verzí pSC11, díky přísadě sekvence spojovníku (polylinker), která obsahuje klonovací místo.

Aby se zjistilo, zda je provedena exprese HCV polypeptidu z vaccinia vektoru, mohou být buňky BSC1 infektovány s rekombinantním vektorem a pěstovány na sklíčku mikroskopu za podmínek dovolujících expresi. Buňky lze pak fixovat acetonem a provedou se zkoušky imunofluorescence pomocí séra, o němž je známo, že obsahuje anti–HCV protilátky vůči polypeptidům zakódovaným v oblasti genomu HCV, z něhož byl segment HCV v rekombinantním exprimovaném vektoru odvozen.

Mezi jiné systémy eukaryotických nebo virových genomů patří hmyzí buňky a vektory vhodné k použití v těchto buňkách. Tyto systémy jsou v oboru známé a zahrnují například hmyzí exprimované transferové vektory, odvozené od baculoviru Autography californica nukleárního polyherového viru (AcNPV), kterým je na pomocníku závislý virový expresní vektor. Expresní vektory, odvozené od tohoto systému, používají obvykle silného genového promotoru virového polyhedrinu k řízení exprese heterologových genů. Běžně nejčastěji používaným transférovým

vektorem k začleňování cizích genů AcNPV je pAc373. Mnohé jiné, odborníkům známé vektory byly také určeny ke zlepšení exprese. Patří mezi ně například pVL985 (který mění počáteční polyhedrinový kodon z ATG na ATT, a který zavádí pár bází BamHI klonovacího místa 32 po proudu od ATT; (viz Luckow a Summers (1989) Virology 17, str. 31). Dobrá exprese nespojených cizích proteinů vyžaduje obvykle cizí geny, které mají ideálně krátkou vůdčí sekvenci obsahující vhodné signály k iniciaci translace předcházející počáteční signál ATG. Plazmid obsahuje také polyhedrin polyadenylový signál a amplicilinu rezistentní (amp) gen a počátek replikace pro selekci a šíření v E. Coli.

Způsoby zavádění heterologního DNA do požadovaného místa v baculoviru jsou v oboru známé. (viz Summer a Smith, Texas Agricular Experiment Station Bulletin číslo 1 555; Ju a kol. (1987); Smith a kol. (1983) Mol. & Cell Biol. 3, str. 2 156 až 2 165; a Luckow a Summers (1989) Virology 17, str. 31). Například může být začlenění do genu takového, jakým je polyhedrinový gen, homologovou rekombinací; začlenění může být také do restrikčního enzymového místa zaměřeného do požadovaného baculovirového genu. Začleněnými sekvencemi mohou být sekvence, které kódují všechny nebo odchylné segmenty polyproteinu nebo jiných orfs, které kódují virové polypeptidy.

Signály pro posttranslační modifikace, jako je signál peptidového štěpení, proteolytického štěpení a fosforylace, se jeví jako rozeznatelné hmyzími buňkami. Signály potřebné k sekreci a nukleární akumulaci se jeví rovněž jako konzervované mezi buňkami bezobratlých a obratlovců. Příklady signálních sekvencí buněk obratlovců, jež jsou účinné v buňkách bezobratlých, jsou v oboru známé, například u lidského interleukin–2 signálu (IL–2), což je signál pro transport z buňky, je rozeznáván a čistě odstraňován ve hmyzích buňkách.

Struktura imunologických testů

HCV antigeny E1 a E2 podle tohoto vynálezu mohou být uplatněny v obecně jakékoli struktuře, která používá známých antigenů k detekci protilátek. Ovšem struktury, které deformují sledovaný konformační epitop HCV je třeba vyloučit nebo modifikovat. Společným znakem všech těchto testů je, že se uvádí do styku antigen s tělesnou složkou, u níž je podezření, že obsahuje protilátky HCV za podmínek, které umožní vazbu antigenu na kteroukoli takovou protilátku přítomnou ve složce. Takovými podmínkami jsou typicky fyziologická teplota, hodnota pH a iontová pevnost, používající nadbytku antigenu.po inkubaci antigenu se vzorkem následuje detekce imunitních komplexů daných antigenem.

Plánování imunologických testů podléhá do značné míry změnám, v oboru jsou známé mnohé struktury.protokoly mohou například zahrnovat pevné nosiče nebo imunoprecipitaci. Většina testů používá značkovaných protilátek nebo polypeptidů; značení může být například pomocí molekul enzymatických, fluorescenčních, chemiluminiscenčních, radioaktivních nebo barevných.testy, které zesilují signály z imunitního komplexu jsou také známy; jejich příkladem jsou testy používající biotin a avidin a enzymy značené a enzymy zprostředkované imunologické testy, jako jsou testy ELISA.

Imunologické testy mohou mít bez omezení heterogenní nebo homogenní strukturu a mohou být standardního nebo konkurenčního typu. U heterogenních struktur je polypeptid typicky vázán na pevnou matrici nebo nosič k usnadnění separace od polypeptidu po inkubaci. Příklady pevných nosičů, kterých lze použít, je nitrocelulóza (například v podobě membránových nebo mikrotitračních důlků), polyvinylchlorid (například u listů nebo mikrotitračních důlků) polystyrenový latex (například u perlových nebo mikrotitračních destiček, polyvinylidinfluorid – známý jako Immunlon™), diazotizovaný papír, nylonové membrány, aktivované perly a perly Proteinu A. V případě heterogenních struktur může být například použito Dynatech Immunlonu™ 1 nebo Immunlonu™ 2, mikrotitračních destiček nebo polystyrenových perel o průměru 6,35 mm (Precision Plastic Ball).pevný nosič obsahující antigenové polypeptidy se typicky omývá po

oddělení od zkušebního vzorku a před detekcí vázaných protilátek. Jak standardní, tak konkurenční struktury jsou v oboru známé.

U homogenních struktur je zkušební vzorek inkubován s kombinací antigenů v roztoku. Může to být například za podmínek, které vyloučí veškeré komplexy antigen–protilátka, které se vytvoří. Jak standardní, tak konkurenční struktury těchto testů jsou v oboru známé.

U standardní struktury se přímo zaznamenává množství protilátek HCV v komplexu antigen–protilátka. Může se to provádět tak, že se zajišťuje, zda se značené anti–xenotické (například anti–lidské) protilátky, které rozeznají epitop na protilátkách HCV budou vázat vlivem tvoření komplexu. U konkurenční struktury se na množství protilátek HCV usuzuje ze sledování konkurenčního účinku na vazbu známého množství značené protilátky (nebo jiného konkurujícího ligandu) v komplexu.

Vytvářené komplexy obsahující anti–HCV protilátky (nebo v případě konkurenčních testů, množství konkurující protilátky) se zjišťují řadou známých technik, závisejících na struktuře. Například detekci neznačených protilátek HCV v komplexu lze provádět pomocí konjunkce antixenotických Ig v komplexu se značkou (například s enzymovým značením).

U testu imunoprecipitační nebo aglutinační struktury vytváří reakce mezi antigeny HCV a protilátkami síťoví, které precipituje z roztoku nebo suspenze a tvoří viditelný povlak nebo film precipitátu. Není–li přítomná žádná protilátka HCV, nevytvoří se žádný viditelný precipitát.

Běžně existují tři specifické typy testů částicové aglutinace (PA). Těchto testů se používá k detekci protilátek na různých antigenech, jsou–li povlečeny na nosiči. Jedním typem takových hemaglutinačních testů používajících červených krvinek (RBC), které jsou senzibilizovány pasivní adsorpcí antigenu (nebo protilátky) na RBC. Přísada specifických popřípadě přítomných antigenových protilátek v tělesné složce způsobí, že se RBC povlečou vyčištěným antigenem k aglutinátu.

Aby se vyloučily potenciální nespecifické reakce v hemaglutinačním testu, musí se použít dvou umělých nosičů místo RBC v PA. Z nich jsou nejběžnější latexové částice. Lze však také použít želatinových částic. Testy používající kteréhokoli z těchto nosičů jsou založeny na pasivní aglutinaci částic povlečených vyčištěnými antigeny.

Antigeny HCV E1 a E2 konformačních epitopů se typicky balí do souprav používaných v těchto imunitních testech. Souprava obsahuje normálně v oddělených obalech nativní antigen HCV, kontrolní protilátkové formulace (pozitivní a/nebo negativní), značenou protilátku, vyžaduje-li ji struktura a signální reagencie (například enzymový substrát), jestliže značení nevytváří signál přímo. Nativní antigen HCV může být vázán už na pevnou matrici nebo odděleně s reagenciemi pro vázání do matrice. Součástí soupravy jsou obvykle instrukce (například písemně, na pásku a CD–ROM) k provádění testu.

Imunologické testy používající nativního antigenu HCV se hodí ke skrínování krve k přípravě zásoby, z níž potenciální infekční HCV jsou vyloučeny. Způsob přípravy krevní zásoby sestává z následujících kroků. Zreagování tělní součásti, s výhodou krve nebo krevní složky z individuální dárcovské krve s nativním antigenem HCV E1 nebo nativním antigenem E2 k umožnění imunologické reakce mezi případnými protilátkami HCV a antigenem HCV. Zjištění, zda se reakcí vytvořily komplexy anti–HCV protilátky a HCV antigenu jsou výsledkem reakce. Krev přidaná do krevní zásoby od dárců, kteří nevykazují protilátky vůči nativním antigenům HCV E1 nebo E2.

V případech pozitivní reaktivity vůči antigenu HCV je výhodné opakovat imunologický test k vyloučení možnosti falešných pozitiv. Například při skrínování krve ve velkém měřítku k výrobě krevních derivátů (například krve k transfuzím, plazmy, faktoru VIII a imunoglobulinu)

jsou „skrínové“ testy typicky strukturovány ke zvýšení citlivosti (k zajištění, že neprojde žádná kontaminovaná krev) na úkor specificity; to znamená zvýší se míra falešných pozitiv. Tudíž je možno pouze upustit od dalšího testování těch dárců, kteří jsou „opakovaně reaktivní“, to je pozitivní v jednom nebo více imunologických testech darovaného vzorku.

Záměrem následujících příkladů je vynález ilustrovat, bez jeho jakéhokoli omezení.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce PSC59 Poly

Sekvence HCV, použitá ke konstrukci, se izoluje z plazmidu pC5P–1 jako fragment StuI, částečně/BglII. Tento fragment se rozprostírá od prvního methioninového polyproteinu HCV–1 ke kyselině asparagové v pozici 966. Zahrnutými doménami jsou nukleokapsid, C, oba domnělé obaly glykoproteinů, E1 a E2 a zkomolený tvar NS2. Kromě toho obsahuje fragment také asi 60 bp, odpovídajících části 5´–nepřemístěné oblasti genomu HCV.

Fragment se zpracuje Klenowovou polymerázou k vytvoření slepých konců a pak se klonuje do místa StuI vakcínového vektoru, PSC59 (získaného od Dr. B. Mossa z National Institutes of Health, Bethesda, Md). Vektor je znázorněn na obr. 2. V důsledku ligace do polylinkrové sekvence vektoru, obsahuje C´–zakončení oblasti NS2 přídavnou sekvenci Pro–Tyr.

Příklad 2

Příprava zásob Vaccinia Virus zakódováním fragmentu polyproteinu HCV zahrnujícího E1 a E2.

Skrínování pro rekombinantní Vaccinia virus se provádí v podstatě jak je popsáno Mackettem a kol. V knize DNA Cloning svazek II (vydavatel D.M. Glover, IRL Press, Oxford, England, 1985, str. 191 až 211). Specifičtěji se infikuje divokým typem Vaccinia viru (WR–kmen) konfluentní monovrstva (6 cm miska) ledvinových buněk africké zelené opice, BSC40, při několikanásobné infekci (MOI) 0,05. Po dvouhodinové inkubaci při teplotě 37 °C se buňky transfektují 25 µg PSAC59 poly DNA metodou fosfátu vápenatého. Po čtyřech hodinách inkubace se médium zamění za normální a buňky se inkubují dalších 48 hodin při 37 °C. Buňky se získají seškrabáním z misky a virus se uvolní 3 cykly zmrazování–roztávání a uvolněný virus v buněčném lyzátu se uskladní při teplotě –80 °C.

Ke skrínování rekombinantního viru se infikuje konfluentní monovrstva lidských buněk 143 TK dvě hodiny buněčným lyzátem v 10násobných sériových zředěních. Po vyjmutí inokula se přidá 1 % agaróza v sérovém médiu obsahujícím 25 µg/ml 5–bromdeoxyuridinu a buňky se inkubují 72 hodin při teplotě 37 °C. Destičky se zviditelní povlečením buněčné vrstvy 1 % agarózy plus 0,01 % neutrální červeně a inkubováním buněk přes noc při teplotě 37 °C. Agarózový povlak se pak opatrně sejme a buněčná vrstva se odsaje nitrocelulózovým matricovým filtrem (Schleir a Schuell, BA85, 0,45 µm). Získá se replika matricového filtru a označí se hybridizační sondou sekvence HCV značenou ^{32}P. Pozitivní destičky se izolují od matricového filtru, umístí se do 0,5 ml média prostého séra a prozvučí se dvakrát po 30 sekundách.proces skrínování se opakuje dvakrát k vyčištění viru.

K rozšíření rekombinantního Vaccinia viru se infikuje 10 misek (150 cm^2) buněk BSC40 zásobním virem při MOI 0,5. Infekce se provádí dvě hodiny při teplotě 37 °C a virová zásoba se nahradí čerstvým médiem. Po 72 hodinách se buňky shromáždí, suspendují se v 10 Mm

Tris/kyselina chlorovodíková, hodnota pH 9,0 a homogenizují se ve Wheatonově jemném tkáňovém drtiči. Úlomky buněk se izolují odstředěním, supernatanty se trypsinizují a prozvučí a alikvoty virové suspenze se uskladní při teplotě –80 °C.

Příklad 3

Výroba antigenů E1/E2

Jeden litr buněk Hela S3 (spinner cells) se pěstuje v otáčecí baňce (spinner flask) do hustoty 10^6 buněk na ml. Buňky se infikují rekombinantním virem Vaccinia kódujícím polyproteinový fragment HCV pomocí MOI 1,0, inkubují se přes noc, shromáždí a uskladní v podobě buněčných pelet při teplotě –80 °C.

Exprimovaný produkt E1/E2 se vyčistí lyzováním buněk v hypotonickém pufru, s následnou extrakcí neionického detergentu obsaženého v pufru. Buněčný extrakt se podrobí chromatografii na sloupci lecitin (GNA) agaróza. Žádané proteiny se eluují ze sloupce methyl–α–D–manno-pyranosidem (Sigma Corp.). Eluované frakce se monitorují na E1 a E2 Western blots pomocí specifického antiséra vůči E1 nebo E2. Frakce obsahující antigeny se shromáždí a zkoncentrují se na sloupci S–Sepharose (Pharmacia). Čistota konečného produktu je přibližně 70 %.

Příklad 4

Použití imunitních testů E1/E2

Pacienti

Vzorky séra, shromážděné od nahodile vybraných placených dárců krve z východní, západní, středozápadní a jihozápadní části Spojených států, seč získají od Uniglobe Research Corporation (Reseda, ICA). Sérové vzorky, poskytované H.Tongem (Huntington Memorial Hospital v Pasadeně, California), byly získány od skupiny 38 transfuzních pacientů v souvislosti s chronickou NANBH a od jiné skupiny 39 pacientů uživatelů drogy IV s chronickou NANBH. U těchto 77 pacientů nebylo jiné onemocnění jater, byli anti–HAV a anti–Hbsag nereaktivní a protilátky anti–nukleární protilátky (ANA) byly u nich normální. Od H. Alter (the National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) a od Serologicals Incorporation v Clarkston, Georgia se získají tři sérokonverzní transfuzní panely související v HCV. Vzorky akutní rozkladné HCV poskytl ústav Max von Petlenkofer–Institute, University v Mnichově, v Německu. 19 případů akutní rozkladné NANBH bylo diagnostikováno na základě jaterního drobnohledného vyšetření a na základě dlouhodobého studování (2 až 11 let) úrovní normální amino transferázy (ALT).

Exprese a čištění rekombinantních antigenů HCV

V kvasinkách S. cerevisiae se podrobí expresi antigeny C22 (119aa), E1 (130aa), E2 (251aa), NS5 (942aa) a chimérický C25 (nazývaný též c200/c22) (858aa), jako C–terminálové fúze s lidskou superoxidovou dismutázou (SOD) způsoby popsanými prvně Kuem G. A kol., Science (1989) 244, str. 362 až 364 a Cousensem L. A kol. Gene (1987) 61, str. 265 až 272. Antigen C33C (266aa) se podrobí expresi jako interní SOD spojený polypeptid v E. Coli způsoby popsanými dříve pro syntézu 5–1–1 antigenu (viz PCT WO 89/046 699, EP 0 318 216 a Hougton a kol. Science 244, str. 359 (1989). Po rozmělnění buněk a odstředění se z buněčných pelet získají extrakcí nerozpustné SOD spojené polypeptidy použitím 5M močoviny nebo 1 % SDS a vyčistí se buď gelovou filtrací nebo kombinací iontoměničové chromatografie (Q a S–sepharose) a gelové filtrační chromatografie (Sephacryl).

HCV nativní antigen E1 a E2 [nazývaný též rVV (el & e2)] se vyčistí z endoplastického retikula infikovaných buněk rekombinantního Vaccinia viru (rvv), které obsahují plnou délku genů HCV E1 a E2. Čištění se provede afinitní chromatografií, následovanou iontoměničovou chromatografií za nedenaturizujících podmínek. Tyto metody jsou popsány v patentovém spise WO 92/08 734.

Nativní antigen HCV E2, CHO–e2 se připraví v podstatě podle Spaeta a kol., Virology (1991) 188, str. 819 až 830. Zvláště se konstruuje savčí řada buněk CHO vytvářející antigen CHO–e2 z plazmidu obsahujícího sekvenci HCV–1 kódující Ala383 na Glu611. Plazmid se pak transfektuje do buněk CHO k vytvoření stabilní linie expresující antigen e2 s plnou délkou (nazývaný též e2/ns1). Klony, vykazující vysokou expresi, se volí a expandují ve válcových lahvích za růstu v DMR/H21 s 10 % dialyzovaným zárodečným telecím sérem a obvyklými doplňky plus 1,6 μM Methotrexatu. Supernatant kultivačního prostředí se shromáždí a použije se k čištění antigenu ECHO–e2. Čisticí schéma zahrnuje afinitu a iontoměničovou chromatografii za nedenaturujících podmínek.

K rozrušení nativních domnělých konformačních epitopů e2 se připraví denaturovaný CHO–e2 přísadou DL–dithiothreitolu (DTT) na konečnou koncentraci 10 Mm, 0,2 % dodecylsulfát sodný (SDS) a vaří se 5 minut při teplotě 100 °C. Všechny rekombinantní antigeny HCV se považují za alespoň z 90 % čisté analýzou polyakrylamidového gelu SDS a obarvením Coomassiovou modří.

Testy ELISA

Antigeny RVV (e1 & e2), CHO–e2 a denaturovaný CHO–e2 se zředí na optimální koncentraci ve fosfátem pufrované solance (PBS) (hodnota pH 7,4) a nanesou se na destičky Immunlon™1 (Dynatech, Chantily, FA). Testy ELISA se provádějí takto:Zkušební vzorky na destičce se zředí 40násobně v ředidle vzorků a inkubují se jednu hodinu při teplotě 37 °C a pak se promyjí promývacím pufrem. Do každého důlku se přidá polyklonální kozí anti–humánní protilátka IgG (H+L) konjugovaná ke křenové peroxidáze (HRPO). Destičky se inkubují po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C a pak se promyjí o–fenylendiaminem 2 Hcl (OPD) a přidá se peroxid vodíku k vyvolání barvy HRP. Výsledky se čtou pomocí destičkového čtecího zařízení při 492/630 nm. Závěrečné hodnoty ELISA O.D. pro antigen RVV (e1 & e2), SOD, C25, C22, C33C a ns–5 jsou 0,4 plus O.D. ze středu negativních hodnot. Závěrečné hodnoty CHO–e2 a denaturovaného CHO–e2 jsou 0,4 O.D. plus O.D. z odpovídající negativní regulace antigenu. Závěrečná hodnota anti–C100–3 je 0,45 O.D. plus jeho střed negativní controly O.D.

Imunologické testy

Výsledky testů ELISA pomocí uvedených antigenů k detekci anti–HCV protilátek v krevních složkách od skupiny amerických pacientů jsou v tabulce I.

Tabulka I

Převládající protilátky HCV u skupin amerických pacientů

skupina	počet pacientů	anti-HCV pozitivní									
		C22	Y-e1	Y-e2	CHO-e2	rVV (e1 & e2)	C33C	C100-3	Ns5	C25	ANY
A placení dárci	158	29 18%	19 12%	15 9%	30 19%	30 19%	30 19%	26 17%	27 17%	32 20%	32 20%
B pacienti s chronickou posttransfusní NANBH	38	35 92%	22 58%	21 55%	36 95%	36 95%	36 95%	27 71%	28 74%	36 95%	36 95%
C pacienti s NANBH užívající drogu IV	39	39 100%	17 44%	13 33%	39 100%	39 100%	39 100%	27 69%	32 82%	39 100%	39 100%

A Nahodile vybraní placení dárci krve z východní, západní, středozápadní a jihozápadní části Spojených států U.S.A

B & C Sérové vzorky od 77 pacientů s chronickou NANB hepatitis z nemocnice Hunington Memorial Hospital, Pasadena, CA, kteří měli v minulosti transfuzi krve nebo záznam o užívání drogy IV.

Výsledky v tabulce I ukazují, že kvasinkami vyprodukované obalové antigeny HCV e1 a e2 jsou značně méně imunoreaktivní než rekombinantní antigeny vyrobené z Vaccinia viru RVV (e1 & e2) a v buňkách CHO, CHO–e2. U každé ze zkoušených skupin byla aktivita antigenů e1 a e2, vytvářených kvasinkami, pouze 2/3 nebo menší než u antigenů produkovaných zvířecími buňkami. Je pozoruhodné, že kvasinkové antigeny e1 a e2 produkované v kvasinkových buňkách byly čištěny za denaturačních podmínek. Má se tudíž zato, že v těchto antigenech existují pouze lineární epitopy. Na rozdíl od toho, byly nativní antigeny HCV, RVV(e1 & e2) a CHO–e2 izolovány z hostitelských zvířecích buněk za nedenaturačních podmínek, připouštějících existenci nativních konformačních epitopů.

Rekombinantní nativní antigeny HCV získané expresí z genů E1 a E2 v buňkách se jeví jako stejně imunoreaktivní jako C33C a snad C25 a imunoreaktivnější než kterýkoli jiný z testovaných antigenů HCV. C25 je chimérický polyprotein sestávající z částí NS_3, NS_4 a C polypeptidů spojených podle obr. 1.

Úloha konformačních epitopů spočívající ve stimulaci časné odezvy hostícího imunitního systému se vyhodnocuje imunologickým testem sérokonverzních panelů HCV. Výsledky v tabulce II ukazují imunoireaktivitu nativních obalových antigenů HCV, RVV(e1 & e2) a CHO–e2 u vzorků ve třech sérokonverzních panelech. Každý vzorek v panelech představuje následný odběr krve jedince s posttranfuzní NANBH. Jak vyplývá z výsledků v tabulce II, nativní obalové antigeny HCV, to je antigeny s přírodními konformačními epitopy, zjišťují protilátky, které se jeví poměrně časně v průběhu infekce, ve srovnání s protilátkami, jež se zjišťují jinými zkoušenými antigeny HCV. Tyto antigeny mohou být tudíž velmi vhodné k použití v imunologických testech k diagnóze infekce HCV.

Tabulka II

Porovnání CHO-e2, rVV (e1 & e2) a multiantigenní ELISY na serokonverzních panelech

vzorek	datum odbiru krve	počet dní po transfuzi	CHO-e2 ELISA S/CO	rVV (e1 & e2) ELISA S/CO	C22 ELISA S/CO	C33C ELISA S/CO	C100-3 ELISA S/CO	ns5 ELISA S/CO	C25 ELISA S/CO	ALT Level IU/L
(1) Sérokonverzní panel A										
A1	07/18/88	0	0,61	0,6	0,01	0,01	0,09	0,03	0,02	23
A6	08/15/88	28	0,19	0,2	0,02	0,02	0,01	0,03	0,21	39
A7	08/25/88	38	1,23	1,75	0,38	1,21	0,12	0,28	1,63	274
A8	08/29/88	42	1,97	2,28	0,42	3,52	0,07	0,32	2,83	346
A9	09/14/88	58	2,88	2,8	2,66	4,48	2,45	0,81	6,03	1175
(2) Sérokonverzní panel C										
C1	07/28/88	0	0,07	0,12	0,08	0,08	0,21	0,23	0,01	22
C6	08/25/88	28	0,54	0,31	0,13	0,11	0,21	0,15	0,02	53
C7	08/29/88	32	1,29	0,43	0,08	0,08	0,10	0,09	0,02	63
C8	09/01/88	35	2,25	1,29	0,26	0,28	0,18	0,13	0,32	81
C9	09/08/88	42	6,14	2,62	1,38	0,86	0,15	0,13	2,11	183
C10	09/28/88	62	7,68	3,42	5,32	4,79	1,68	0,12	6,65	563
(3) Sérokonverzní panel J										
J1	07/04/76	0	0,13	0,09	0,07	0,03	0,02	0,02	0,08	13
J2	07/16/76	12	0,05	0,06	0,03	0,04	0,01	0,01	0,10	56
J3	07/20/76	16	0,06	0,09	0,02	0,03	0,06	0,03	0,07	34
J4	08/02/76	29	0,07	0,14	0,06	0,10	0,08	0,07	0,06	19
J5	08/09/76	36	0,12	0,16	0,08	0,08	0,07	0,08	0,09	19
J6	08/17/76	44	0,05	0,14	0,07	0,11	0,08	0,07	0,11	23
J7	09/09/76	67	0,10	0,10	0,11	0,09	0,10	0,09	0,12	163
J8	09/13/76	71	1,03	0,64	0,62	0,21	0,07	0,07	0,68	168
J9	09/20/76	78	1,78	1,10	1,14	0,42	0,08	0,08	1,88	320
J10	09/27/76	85	2,22	2,35	2,10	0,87	0,04	0,07	3,25	660

Tabulka II (pokračování)

vzorek	datum odbìru krve	počet dní po transfuzi	CHO-e2 ELISA S/CO	rVV (e1 & e2) ELISA S/CO	C22 ELISA S/CO	C33C ELISA S/CO	C100-3 ELISA S/CO	ns5 ELISA S/CO	C25 ELISA S/CO	ALT hladina IU/L
(4) Sérokonverzní panel B										
B1	07/19/88	0	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,21	0,09	11
B10	08/26/88	39	0,11	0,35	0,12	0,17	0,10	0,28	0,18	78
B11	08/30/88	43	0,06	0,48	0,63	0,15	0,08	0,27	0,48	180
B12	09/28/88	72	0,26	1,63	6,38	5,19	0,18	0,54	5,88	401
B13	11/09/88	114	0,16	2,18	4,95	5,99	4,15	8,16	6,78	72

× Hodnoty ke dni odběru vzorků.

S/CO: test. signál OD/ukončení OD hodnoty.

Výsledky v tabulce III ukazují porovnání nativních antigenů HCV získaných expresí z genů E1 a E2 se srovnatelnými denaturovanými antigeny. V tabulce byla sledována v závislosti na čase imunoreaktivita séra od pacientů s akutní rozlišenou NANBH a je porovnána s imunoreaktivitou pacientů s chronickou NANBH. Jak z tabulky III vyplývá, vykazují větší imunoreaktivitu nativní obalové antigeny, které obsahují jak konformační, tak lineární epitopy, RVV(e1 & e2) a CHO–e než antigeny obsahující pouze lineární epitopy e1 a e2 (produkované v kvasinkách) a denaturované CHO–e2. Celkově je zřejmé, že imunoreaktivita nativních obalových antigenů HCV se zvyšuje 8– až 9–krát u pacientů s akutní rozlišenou a jen asi 2–krát u pacientů s chronickou NANBH. Jeví se tedy, že většina imunologické odezvy u pacientů s rozlišenou formou NANBH se týká konformačních epitopů, zatímco u akutní formy je přibližně stejnoměrně rozdělena mezi konformační a lineární epitopy.

Tyto studie představují první poznatek, že konformační epitopy se mohou týkat imunologické odezvy na HCV u hostitelského jedince.

Tabulka III

Převaha anti–HCV antigenů obsahujících konformační epitopy oproti antigenům obsahujícím pouze lineární epitopy u rozlišené a chronické NANBH.

Diagnóza	Počet (%) anti–HCV pozitivních po transfuzi Akutní rozlišené NANBH		Chronická NANBH	
Doba po transfuzi	0–6 měsíců	6–12 měsíců	> 12 měsíců	
Antigeny HCV				
C25	19/19* (100 %)	19/19* (100 %)	18/19* (95 %)	9/9* (100 %)
rVV(e1 & e2)	16/19* (84 %)	17/19* (89 %)	16/19* (84 %)	9/9* (100 %)
CHO–e2	11/19* (58 %)	12/19* (63 %)	13/19* (68 %)	9/9* (100 %)
CHO–e2 (denatur.)	1/19* (5 %)	3/19* (16 %)	4/19* (21 %)	5/9* (56 %)
e1	1/19* (5 %)	1/19* (5 %)	4/19* (21 %)	4/9* (44 %)
e2	2/19* (11 %)	4/19* (21 %)	4/19* (21 %)	4/9* (44 %)

* Počet pozitivních/počet testovaných

** Diagnóza akutní rozlišené NANBH na základě biopsie (převládající většina drobnohledně zjištěná) a rozlišení prezistence transamináz.

Příklad 5

Imunologický test E1/E2: Porovnání pacientů imunokompetentních a imunosupresních

Pacienti

Studují se tři skupiny pacientů. Všichni pacienti jsou negativní na protilátky vůči viru HIV. Skupinu I tvoří 20 imunokompetentních pacientů s chronickou infekcí HCV získanou transfuzí, kteří jsou jinak zdrávi. Všichni pacienti jsou pozitivní na anti–HCV a HCV RNA. Skupinu II tvoří 15 pacientů na hemodialýze. Jedenáct z nich je anti–HCV pozitivních na příjmu, jeden měl v průběhu transplantaci ledviny. Pět pacientů se stalo anti–HCV pozitivních v průběhu. Skupinu

III tvoří 17 příjemců ledvinových transplantátů. Sedm pacientů je HCV a HCV RNA pozitivních na příjmu. Sedm se stalo anti–HCV pozitivních v průběhu, z nichž dva byli napřed sami HCV RNA pozitivní. Dva pacienti byli HCV RNA samotné pozitivní na příjmu, oba zůstali HCV RNA pozitivní, ale anti–HCV negativní v průběhu. Jeden pacient se stal pozitivním HCV RNA pouze v průběhu.

Séra

Séra se záměrně shromáždila během července 1989 a dubna 1992 a byla uložena v alikvotech při –70 °C před testováním. Dva až čtyři vzorky shromážděné v intervalech 6 až 12 měsíců byly testovány pro pacienty skupiny I. Dva vzorky shromážděné v intervalu 1,5 až 2 let byly testovány pro všechny pacienty skupiny II a III; dodatečné vzorky v intervenční periodě a průběžné vzorky byly také testovány pro pacienty, kteří se změnili ze stavu anti–HCV a/nebo HCV RNA ve druhém vzorku.

Testy ELISA

Antigeny HCV se připraví podle příkladu 4 a použijí se k testům ELISA, jak popsáno v příkladu 4. U testů N e1 & e2 se redukuje falešná pozitivita způsobená vázáním vaccinia proteinu (i) přísadou vaccinia buněčného lyzátu k ředidlu vzorku, aby sloužil jako konkurenční antigen a (ii) použitím vaccinia reaktivních vzorků jako negativních kontrolních vzorků.

Výsledky jsou znázorněny na obr. 3A až 3C. Pouze 55 % imunokompetentních pacientů skupiny I reagovalo na antigeny e1 nebo e2 expresované v kvasinkách; avšak všichni pacienti reagovali na nativní, glykosilované antigeny e1 & e2 expresované ve vaccinia viru. Jako u imunokompetentních pacientů, byla většina hemodialyzních pacientů skupiny II reaktivních na antigeny C25, C22 a N e1 & e2. Významně nižší podíl pacientů reagoval s C100–3, C332C, NS–5, e1 a e2. Ve srovnání s imunokompetentními pacienty reagovalo významně méně příjemců ledvinových transplantátů skupiny III vůči všem testovaným antigenům HCV.

Všichni imunokompetentní pacienti reagovali na C25, C22 a C33C; 90 % reagovalo na NS–5 a 80 % na V100–3. Pouze 55 % reagovalo na z kvasinek odvozené antigeny e1 & e2, avšak všichni reagovali na vaccinia expresované antigeny N e1 & e2, což značí, že obalové epitopy jsou konformační a glykosilované. 65 % až 90 % dialyzovaných pacientů a pacientů s transplantací ledviny reagovalo na C25, C22 a N e1 & e2, avšak pouze 1 % až 60 % reagovalo na C21100–3, C33C a NS–5. Zmenšení nebo ztráta reaktivity na antigenech hepatitis C viru byla pozorována po transplantaci ledviny nebo kostní dřeně, přičemž C25 a N e1 & e2 byly méně ovlivněny.

To naznačuje, že epitopy e1 & e2 jsou konformační a reaktivita vůči těmto epitopům je minimálně ovlivněna potlačením imunity oproti jiným antigenům HCV.

Průmyslová využitelnost

Způsoby imunologických testů, používající obalové antigeny HCV, které obsahují konformační epitopy reaktivní s protilátkami v séru od infikovaných jedinců, se hodí ke skrínování a diagnózám. Tyto antigeny detekují protilátky, jež nejsou detekovány denaturovanými obalovými antigeny HCV. Kromě toho tyto obalové antigeny HCV, tvořené konformačními epitopy, jsou imunologicky reaktivnější než řada jiných antigenů HCV.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob detekce časné sérokonverze u savčích hostitelů s virem hepatitidy C, HCV, který zahrnuje tyto kroky:

a) získá se od hostitele tělesná složka, u níž je podezření, že obsahuje protilátky na HCV,

b) tato tělesná složka se uvádí do styku s HCV antigenem a se standardní kontrolou za podmínek umožňujících imunologickou reakci a

c) stanoví se přítomnost imunitních komplexů těchto protilátek a tohoto antigenu, přičemž nepřítomnost těchto imunitních komplexů standardní kontroly a přítomnost imunitních komplexů obsahujících HCV antigen indikuje sérokonverzi na HCV.

vyznačující se tím, že HCV antigen se volí z antigenu obsahujícího konformačního epitopu, zakódovaného v doméně HCV genomu, v doméně E2 HCV genomu nebo jejich agregátů a čistí se za podmínek, při nichž nedochází k denaturaci.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že antigen HCV je zakódován v doméně E1 genomu HCV.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že antigenem HCV je E1.

4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že antigen HCV je zakódován v doméně E2 genomu HCV.

5. Způsob podle některého z nároků 1 nebo 4, **vyznačující se tím**, že antigenem HCV je E2.

6. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že antigenem HCV je agregát E1/E2.

7. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že antigenem HCV je agregát E1/E1.

8. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že antigenem HCV je agregát E2/E2.

9. Způsob podle některého z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že HCV antigen nebo agregát je exprimován z rekombinantního vaccinia viru.

10. Způsob podle některého z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že HCV antigen nebo agregát je exprimován v buňkách CHO.

11. Způsob detekce protilátek HCV u savčích hostitelů, který zahrnuje tyto kroky:

a) odebírá se od hostitele tělesná složka, u níž je podezření, že obsahuje protilátky na HCV,

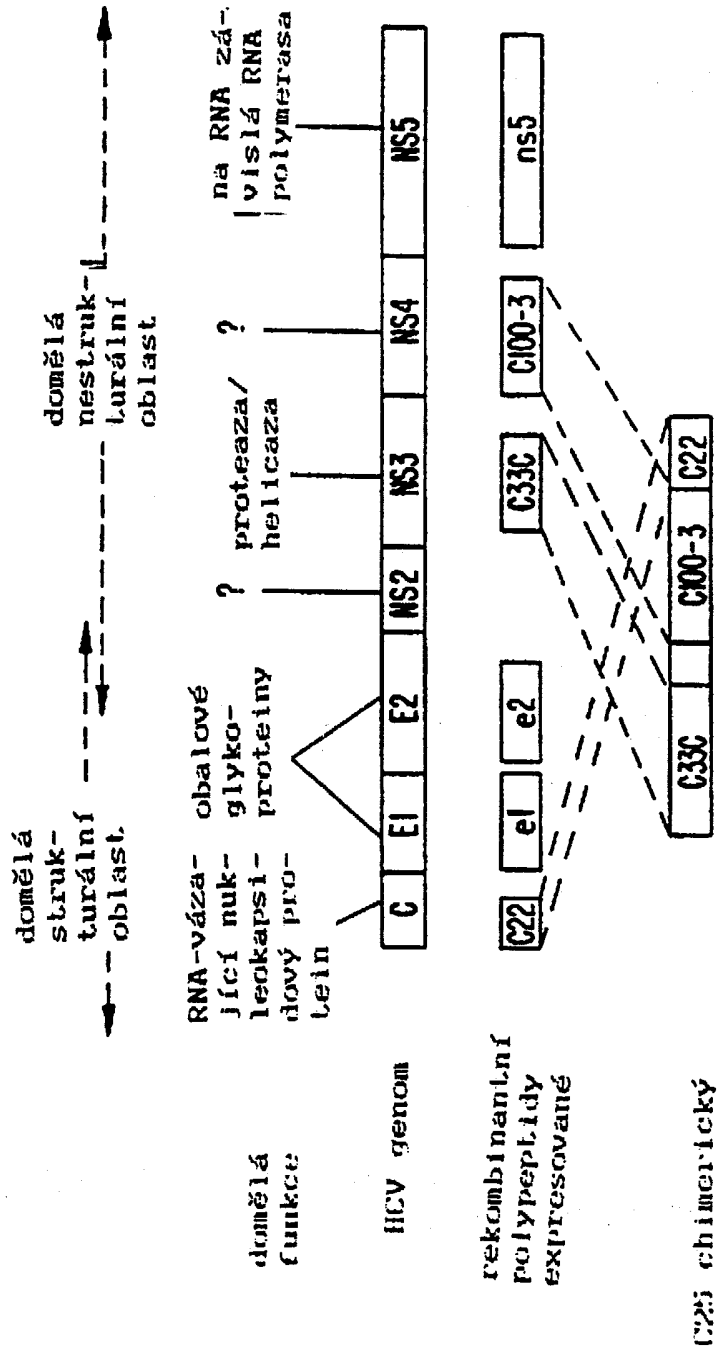
b) tato tělesná složka se uvádí do styku s alespoň dvěma antigeny HCV za podmínek umožňujících imunologickou reakci a

c) stanoví se přítomnost imunitních komplexů tohoto antigenu a těchto protilátek,

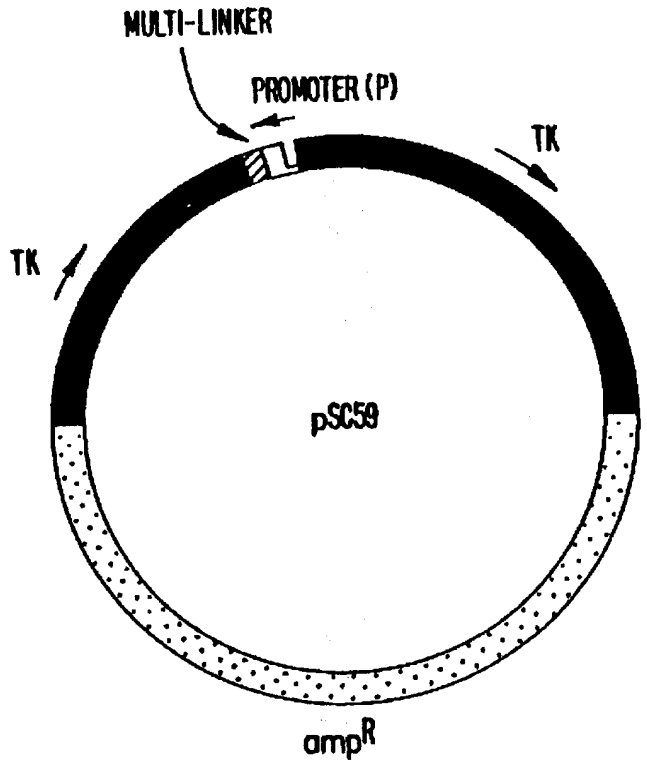
vyznačující se tím, že imunitní komplexy se detekují v časné sérokonverzi a alespoň jeden z HCV antigenů se volí ze souboru zahrnujícího HCV antigen obsahující konformační epitop zakódovaný v doméně E1 HCV genomu, antigen obsahující konformační epitop zakódovaný v doméně E2 HCV genomu a jejich agregátů a čistí se za podmínek, při nichž nedochází k denaturaci.

12. Kit k použití při způsobu podle některého z nároků 1 až 11, **vyznačující se tím**, že obsahuje antigen HCV a kontrolní standardy, balené ve vhodných ampulkách a instrukce pro použití kitu.

3 výkresy


domělá
struk-
turální
oblast
domělá
nestruk-
turální
oblast
RNA-váza-
jící nuk-
leokapsi-
dový pro-
tein
obalové
glyko-
proteiny
?
protéaza/
helikáza
?
na RNA zá-
vislá RNA
polymeráza
domělá
funkce
HCV genom
C
E1
E2
NS2
NS3
NS4
NS5
rekombinantní
polypeptidy
exprimované
C22
e1
e2
C33C
C100-3
ns5
C22 chimerický
polypeptid
C33C
C100-3
C22

OBR. 1



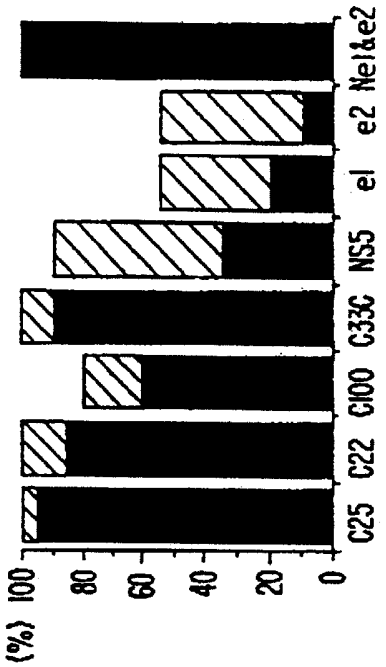
OBR. 2

translace

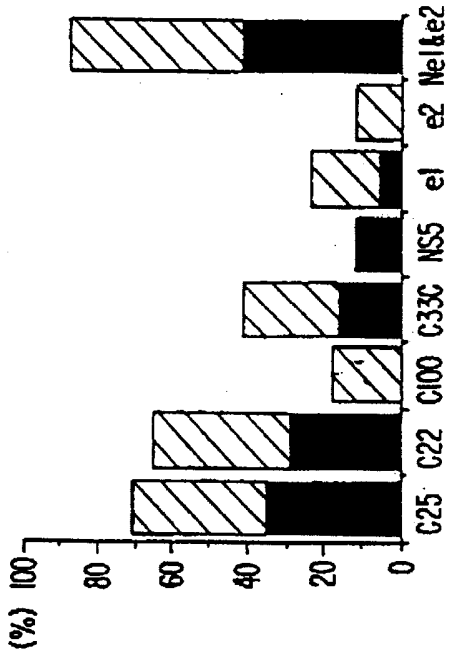
5' vacT stop SpeI StuI EcoRI XhoI HindIII SalI BamHI 3'
TK--AGAAAAACTAGTTACTTAACTAGTAGGCCTGAATTCCTCGAG-P-AAGCTTGTCGACGGATCC--TK

VacT: transkripce terminačního signálu pro původní vaccinia virus mRNA

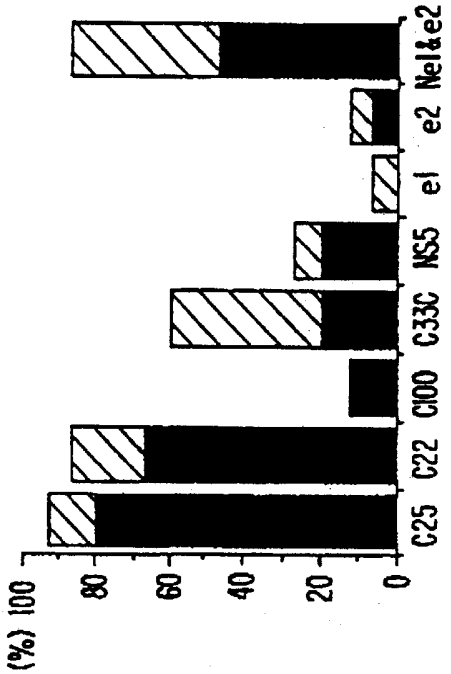
P: syntetický promotor přibližně 60 bp



OBR. 3A



OBR. 3C



OBR. 3B

Konec dokumentu