

(19)



(10) **LT 5414 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **5414** (51) Int. Cl. (2006): **C07K 16/00**
C12N 5/12
C12N 15/00
- (21) Paraiškos numeris: **2005 043**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2005 04 13**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2006 10 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **2007 04 25**
- (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:
Aurelija ŽVIRBLIENĖ, LT
Alma GEDVILAITĖ, LT
Rainer ULRICH, DE
Kęstutis SASNAUSKAS, LT
- (73) Patent savininkas:
BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS, Graičiūno g. 8, LT-02241 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis:
Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis”,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:

Monokloninių antikūnų gavimo būdas, hibridomos, gautos šiuo būdu ir rekombinantinės chimerinės į virusus panašios dalelės su įterptais kitų baltymų fragmentais kaip imunogenai hibridomų gavimui šiuo būdu

- (57) Referatas:

Išradimas apibūdina monokloninių antikūnų gavimo būdą, panaudojant rekombinantinius chimerinius virusų baltymus, kurie formuoja į virusus panašias daleles. Minėti virusų baltymai yra naudojami kaip nešėjai peptidams arba epitopams, prieš kuriuos siekiama gauti monokloninius antikūnus. Pasiūlyti chimeriniai virusiniai baltymai tam tikrose vietose turi įterptus kitų baltymų fragmentus (epitopus), kurie yra eksponuoti į virusą panašių dalelių paviršiuje. Minėti chimeriniai baltymai yra labiau imunogeniški ir efektyviau skatina monokloninių antikūnų susidarymą, nei anksčiau aprašyti imunogenai. Išradimas priklauso biotechnologijos sričiai ir gali būti panaudotas

hibridomų technologijoje monokloninių antikūnų prieš norimus epitopus gavimui.
Išradime apibūdintos gautos šiuo būdu naujos hibridomos.

- 5 Šis išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai, konkrečiai, monokloninių antikūnų gavimo būdai. Būdas gali būti naudojamas hibridomų technologijoje naujų monokloninių antikūnų prieš norimus epitopus gavimui.

Norint gauti monokloninius antikūnus (MA) prieš bet koki antigeną, paprastai naudojami žinomi, anksčiau aprašyti būdai, kuriuose:

- 10 - imunizacijai naudojami rekombinantiniai baltymai; arba
- naudojami sintetiniai antigenai; arba
- naudojami natyvūs baltymai, išskirti iš ląstelių, audinių ir pan; arba
- naudojami ląstelių lizatai (homogenatai); arba
- naudojamos eukariotinės ląstelės; arba
15 - naudojami virusai, bakterijos.

- Hibridomų technologijoje monokloninių antikūnų gavimui reikalingi stiprūs imunogenai, kurie aktyvuoja B ir T ląsteles, sukelia IgG klasės antikūnų susidarymą. Imunogenai yra medžiagos, kurios sukelia imuninį atsaką. Yra žinoma, kad stiprūs imunogenai yra didelės molekulinės masės baltymai. Nedidelės molekulinės masės peptidai (iki 50 aminorūgščių
20 ilgio) nėra imunogenai. Siekiant gauti monokloninius antikūnus prieš peptidus, pastarieji turi būti prijungiami prie baltymo-nešėjo.

Yra aprašyti įvairūs baltymai-nešėjai, naudojami hibridomų technologijoje: jaučio serumo albuminas (BSA), moliuskų hemacianinas (KLH), tuberkulino derivatai (PPD) ir kiti
[Bhatnagar PK, Papas E, Blum HE, et al., Acad Sci U S A. 1982 Jul;79(14):4400-4;

- 25 Bashir I, Sikora K, Foster CS. Virchow Arch. 1998 Mar;432(3):279-87].

Žinomi įvairūs būdai, kuriais peptidai prijungiami prie baltymo-nešėjo. Peptidas gali būti prijungimas prie baltymo-nešėjo, naudojant įvairius cheminius agentus. Pavyzdžiui, žinomas prijungimas, naudojant glutaro aldehidą, karbodiimidą ir kitus cheminius agentus
[Huhle G, Harenberg J, Malsch R, Heene DL. Semin Thromb Hemost. 1994;20(2):193-

- 30 204.] Gali būti naudojamas fotocheminis prijungimas [Jurzak M, Boer R, Fritsch G, Kojro E, Fahrenholz F.. Eur J Biochem. 1990 May 31;190(1):45-52.]. Alternatyviniai būdai yra sintetinių peptidų, sudarytų iš B ir T ląstelių epitopų, kūrimas [Fitzmaurice CJ, Brown LE, McInerney TL, Jackson DC.. Vaccine. 1996 Apr;14(6):553-60].

Visų šių metodų trūkumas – tai, kad peptidas (arba epitopas) gali būti „paslėptas“ baltymo-nešėjo struktūroje, todėl tuo atveju jis negali stimuliuoti imuninės sistemos ląstelių, būtent, B ląstelių, kurios gamina antikūnus ir kurios reikalingos hibridomų gavimui.

- 5 Kitas šių metodų trūkumas yra tas, kad sunku gauti hibridomas, gaminančias antikūnus prieš peptidą, o ne prieš baltymą-nešėją. Baltymas-nešėjas yra žymiai didesnis už prijungtą peptidą, todėl jis turi daugiau B ląstelių epitopų ir efektyviau stimuliuoja B ląsteles, nei peptidas. Todėl net ir tuo atveju, jeigu peptidas yra prieinamas B ląstelėms, paprastai gaunama žymiai daugiau hibridomų, kurios gamina antikūnus prieš baltymą-
10 nešėją, o ne prieš peptidą.

- Nė vienu iš aprašytų atvejų monokloninių antikūnų prieš peptidus gavimui nebuvo panaudoti rekombinantiniai chimeriniai virusų baltymai, pavyzdžiui, mielėse ekspresuoti virusiniai baltymai, tam tikrose molekulės vietose turintys įterptus kito baltymo
15 fragmentus (epitopus) ir formuojantys į virusus panašias daleles.

- Yra žinoma, kad galima žiurkėno poliomos viruso pagrindinio kapsidės baltymo ekspresija mielėse, o taip pat į virusus panašių dalelių (VPD) su įterptais hantaviruso nukleokapsidės baltymo fragmentais savybės [Gedvilaitė A., Frommel C., Sasnauskas K., et al., Virology. 2000, v. 273, n. 1, p. 21-35] Patento EP 1030923 (publ. 2000) aprašyme
20 nurodoma, kad žiurkėno poliomos viruso pagrindinis kapsidės baltymas formuoja į virusus panašias daleles, kurios galėtų būti panaudojamos medicinoje ir veterinarijoje – genų terapijai, vakcinų gamybai bei diagnostikai. Tačiau nebuvo aprašytas šių rekombinantinių baltymų panaudojimas norimo specifiškumo monokloninių antikūnų kūrimui.

- 25 Literatūroje yra aprašytos hibridomų linijos HM02, HM03, G47, BCP7-10, PR81, gaminančios MA prieš žmogaus muciną. Hibridomos HM02 ir HM03 skiriasi tuo, kad: 1) jos gautos, naudojant imunizacijai muciną, išgrynintą iš skreplių, 2) jos gamina IgM klasės antikūnus prieš muciną [Shin CY, Lee WJ, Kim DJ et al, Hybridoma. 1999;18(5):457-463]. Hibridoma G47 skiriasi tuo, kad ji gauta, naudojant imunizacijai
30 muciną, išgrynintą iš žarnyno audinio [Gold DV, Cardillo TM Hybrid Hybridomics. 2001;20(5-6):343-350]. Hibridomos BCP7-10 buvo gautos, naudojant imunizacijai peptidą, atitinkantį baltymo MUC1 seką PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP, chemiškai

- prijungtą prie baltymo-nešėjo [Xing PX, Prenzoska J, Quelch K, McKenzie IF, Cancer Res. 1992 15;52(8):2310-2317]. Hibridoma PR81, gaminanti IgG1 subtipo MA prieš žmogaus muciną, buvo gauta, atlikus imunizaciją vėžinio audinio homogenatu [Paknejad M, Rasae MJ, Tehrani FK et al, Hybrid Hybridomics. 2003;22(3):153-158].
- 5 Aprašytos kitos hibridomų linijos, gaminančios MA prieš hantavirusų nukleokapsidės baltymą: ECO2, ECO1, BDO1, C16D11, F23A1, C24B4, E5/G6, DCO3. Hibridomos ECO2, ECO1 ir BDO1 buvo gautos, naudojant imunizacijai inaktyvuotus *Hantaan*, R22 ir *Puumala* kamienų hantavirusus [Ruo SL, Sanchez A, Elliott LH Arch Virol. 1991;119(1-2):1-11]. Hibridomos C16D11, F23A1, C24B4, E5/G6 buvo gautos, naudojant
- 10 imunizacijai rekombinantinį pilno ilgio hantaviruso nukleokapsidės baltymą [Yoshimatsu, K., J. Arikawa, M. Tamura et al, J. Gen. Virol. 1996, 77:695-704]. Nustatyta, kad hibridoma E5/G6 gamina MA, specifiskus hantaviruso nukleokapsidės sekai tarp 165 ir 173 aminorūgščių [Okumura M, Yoshimatsu K, Araki K, Arch Virol. 2004;149(12):2427-2434]. Hibridoma DC03 buvo gauta, naudojant imunizacijai rekombinantinį SEO
- 15 kamieno hantavirusų pilno ilgio nukleokapsidės baltymą, ekspresuotą bakuloviruso ekspresijos sistemoje [Morii M, Yoshimatsu K, Arikawa et al, J Clin Microbiol. 1998;36(9):2514-2521]. Aprašytieji analogai skiriasi tuo, kad imunizacijai buvo naudojami arba pilno ilgio rekombinantiniai hantavirusų nukleokapsidės baltymai, arba virusai, bet ne VPD, turinčios įterptą hantaviruso nukleokapsidės fragmentą.
- 20 Šio išradimo uždavinys buvo gauti monokloninius antikūnus prieš tam tikrą norimą aminorūgščių seką – epitopą arba baltymo fragmentą.
- Išradimo autorių atlikti tyrimai parodė, kad chimeriniai rekombinantiniai virusiniai baltymai, formuojantys į virusus panašias daleles (VPD), gali būti panaudoti imunogenais hibridomų technologijoje naujų monokloninių antikūnų prieš įterptuosius
- 25 fragmentus gavimui.
- Kaip parodė atlikti tyrimai, šiame išradime siūlomi imunogenai efektyviau skatina monokloninių antikūnų susidarymą ir pranoksta analogus iš kitų šaltinių.

- Išradime atskleistas monokloninių antikūnų gavimo būdas apima specialios linijos pelių
- 30 imunizaciją, imunizacijos pakartojimą bent vieną kartą, pelių blužnies ląstelių hibridizaciją, hibridinių klonų dauginimą ir auginimą ir skiriasi tuo, kad imunizaciją atlieka, injekuojant pelėms rekombinantinių chimerinių virusų baltymų su įterptais kito baltymo fragmentais, galinčių formuoti į virusus panašias daleles, tirpalą. Minėti

chimeriniai baltymai yra labiau imunogeniški ir efektyviau skatina monokloninių antikūnų susidarymą, nei anksčiau aprašyti imunogenai.

Be to, konkrečios paskirties monokloninių antikūnų gavimui naudoja į virusus panašias daleles, turinčias baltymų, prieš kuriuos siekiama gauti monokloninius antikūnus, įterptus
5 fragmentus nustatytose į virusą panašios dalelės struktūros vietose, kuriose epitopai yra eksponuoti į virusą panašių dalelių paviršiuje.

Išradime aprašytu būdu buvo gautos naujos hibridomos, produkuojančios monokloninius antikūnus prieš Muc1 peptidą (9 aminorūgščių seką STAPPVHNV) ir prieš hantavirusų
10 nukleokapsidės baltymo fragmentą (N-galinę 120 aminorūgščių seką).

Naujos hibridomos pavadintos 12G2, 12G2, 7A5, 5E11, 5C5, 2E6. Jos deponuotos Biotechnologijos instituto (Vilnius) Imunologijos laboratorijoje; joms suteikti deponavimo numeriai: M0501, M0502, HN0501, HN0502, HN0503, HN0504, atitinkamai.

15

Naujoms hibridomoms gauti buvo naudojamas žiurkėno poliomos viruso pagrindinis kapsidės baltymas, turintis įterptus kitų baltymų fragmentus (epitopus) ir formuojantis į virusus panašias daleles (VPD), atliekant standartines, anksčiau aprašytas procedūras, būtent:

- 20 1) atliekant imunizaciją – VPD buvo suleidžamos BALB/c linijos pelėms po oda. Prieš injekciją VPD tirpalas buvo lygiu tūriu sumaišytas su pilnu Freund'o adjuvantu;
- 2) atliekant pakartotinę imunizaciją - po 4 savaičių pelėms dar kartą buvo suleidžiama tokia pati dozė po oda, prieš tai VPD tirpalą sumaišius su nepilnu
25 Freund'o adjuvantu;
- 3) dar po 4 savaičių buvo suleidžiama tokia pati dozė VPD be adjuvanto. Imunizacijų metu keletą kartų tikrinama, ar imunizuotų pelių kraujo serume atsirado antikūnų prieš įterptąjį fragmentą (epitopą). Patikrinimui buvo naudojami žinomi metodai - imunofermentinė analizė (IFA).
- 30 4) praėjus 4-5 savaitėms po pirmosios imunizacijos, buvo nustatoma, ar serume atsirado specifinių antikūnų. Specifinių antikūnų atsiradimas liudija apie VPD kaip imunogeno efektyvumą, t.y. kad VPD efektyviai stimuliuo B ląsteles, specifiskas įterptajam fragmentui (epitopui);

- 5) po 3 imunizacijų buvo atliekama blužnies ląstelių hibridizacija, suliejant jas su vėžinėmis ląstelėmis, būtent, mieloma Sp2/0, suliejimo agentu buvo naudotas polietilenglikolis (PEG) (Sigma, JAV). Ši ir kitos procedūros buvo atliekamos pagal anksčiau aprašytą procedūrą, naudojamą hibridomų gavimui [Kohler, Milstein, Nature 1975; 256:495-497].
- 6) gavus hibridinių ląstelių klonus (hibridomas), buvo tikrinamas jų specifiškumas, t.y., kokius antikūnus jie gamina. Tam buvo naudojamas IFA metodas. Šio tikrinimo tikslas buvo nustatyti, ar hibridomos gamina antikūnus prieš įterptąjį fragmentą;
- 7) buvo įvertinama, kaip efektyviai įterptasis fragmentas VPD sudėtyje stimuliuoja B ląsteles, iš kurių buvo gautos hibridomos. Gautos hibridomos buvo charakterizuojamos pagal įvairius požymius:
- nustatant jų gaminamų monokloninių antikūnų (MA) izotipą;
 - ištyriant MA specifiškumą IFA ir imunoblotingu metodais, kt.
- 8) identifikavus hibridomas, kurios gamina reikalingo specifiškumo antikūnus, jos buvo klonuojamos, padauginamos ir užšaldomos tolesniam saugojimui;
- 9) hibridomų gaminami antikūnai buvo charakterizuojami anksčiau aprašytais būdais – IFA bei imunoblotingu.
- 20 Taigi, rekombinantiniai chimeriniai baltymai, turintys įterptus kitų baltymų fragmentus arba epitopus, buvo panaudoti pelių BALB/c imunizacijai. Po to imunizuotų pelių blužnies ląstelės buvo sulietos su mielomos ląstelėmis ir gautos hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus prieš įterptąsias aminorūgščių sekas. Chimerinių baltymų, formuojančių į virusus panašias daleles, struktūroje esančios įterptosios sekos yra eksponuojamos baltymo paviršiuje ir todėl efektyviai skatino antikūnų susidarymą.
- Aprašytu būdu buvo gautos ir ištirtos naujos hibridomos, kurios deponuotos Biotechnologijos instituto (Vilnius) Imunologijos laboratorijoje:
- 1) Hibridoma 12B2, deponavimo numeris M0501, kuri gamina IgG1 poklasio (izotipo) MA prieš Muc1 epitopą (9 aminorūgščių seką STAPPVHNV);
 - 2) Hibridoma 12G2, deponavimo numeris M0502, kuri gamina IgG1 poklasio MA prieš Muc1 epitopą (9 aminorūgščių seką STAPPVHNV);

- 3) Hibridoma 7A5, deponavimo numeris HN0501, kuri gamina IgG1 poklasio MA prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą (N-galinę 120 aminorūgščių seką);
- 4) Hibridoma 5E11, deponavimo numeris HN0502, kuri gamina IgG1 poklasio MA prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą (N-galinę 120 aminorūgščių seką);
- 5) Hibridoma 5C5, deponavimo numeris HN0503, kuri gamina IgG2a poklasio MA prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą (N-galinę 120 aminorūgščių seką);
- 6) Hibridoma 2E6, deponavimo numeris HN0504, kuri gamina IgG2b poklasio MA prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą (N-galinę 120 aminorūgščių seką).

10

Hibridomas 12B2, 14G2, 7A5, 5E11, 5C5 ir 2E6 apibūdina šie požymiai.

Morfologiniai požymiai. Hibridomos yra sferinės formos, lygiais kraštais, turi stambų branduolį. Dauginasi suspensijoje, pasižymi silpna adhezija ant stiklo arba plastiko paviršiaus.

- 15 Laštelių kultūros kilmė. Hibridomos gautos, suliejus imunizuotų BALB/c linijos pelių (*Mus.musculus*) blužnies lasteles su pelės (*Mus.musculus*) mielomos laštelių linija Sp2/0.

Laštelių kultūros požymiai. Hibridomų kultivavimo sąlygos standartinės: augimo terpė - Dubecco modifikuota Eagl'o terpė (DMEM) su 2mM L-glutamino, 200 µg/mL gentamicino ir 10% embrioninio veršiuko serumo. Hibridomos auginamos stiklo arba plastiko induose, skirtuose laštelių kultūroms. Ląstelės persėjamos kas 3-4 dienos, persėjimo dozė – 50-100 tūkstančių laštelių mililitre terpės. Hibridomos auginamos inkubatoriuje, kurio atmosferoje yra 5% CO₂, esant 37°C temperatūrai. Ilgalaikiam saugojimui hibridomos užšaldomos embrioniniame serume su 10% DMSO ir laikomos skystame azote. Užšaldymo sąlygos: 1×10^6 - 2×10^6 laštelių mililitre, temperatūros režimas – 1°C per minutę iki -70°C. Po paros ampulės su ląstelėmis perkeliomos į skystą azotą. Kultūrų atgaivinimui ampulės atšildomos 37°C temperatūros vandens vonioje. Laštelių gyvybingumas po atšildymo – 70-80%.

Kontaminacija. Bakterijų ir grybelių hibridomų kultūrose nerasta, mikoplazmos testas neigiamas.

- 30 Hibridomų produktyvumas. MA sekrecijos lygis augimo terpėje – 10-30 µg/ml. MA produkcija išlieka iki 15 pasažų (laštelių kultūros persėjimų).

Produktų charakteristika. Hibridomos 2B12 ir 14G2 gamina IgG klasės, IgG1 poklasio MA, specifiskus Muc1 epitopui (Muc1 epitopas yra žmogaus baltymo – mucino –

fragmentas). Hibridomos 7A5, 5E11, 5C5 ir 2E6 gamina IgG klasės MA, specifiskus hantaviruso nukleokapsidės baltymui.

Šios hibridomos skiriasi nuo kitų anksčiau aprašytų analogų tuo, kad jų gavimui (t.y.,
5 imunizacijai), buvo panaudotos VPD su konkrečių peptidų įterptais fragmentais (epitopais).

Hibridomos 12B2 ir 14G2 skiriasi nuo kitų aprašytų analogų – hibridomų, gaminančių MA prieš muciną – pagal tą požymį, kad imunizacijai buvo naudojamos VPD, turinčios įterptą Mucl epitopą (9 aminorūgščių seką STAPPVHNV). Žinomi žinomi anksčiau
10 aprašyti analogai buvo gauti, naudojant arba sintetinius peptidus, chemiškai prijungtus prie baltymo-nešėjo, arba pilno ilgio mucino baltymą, arba ląstelių homogenatą.

Be to, nuo analogų HM02 ir HM03 hibridomos 12B2 ir 14G2 skiriasi pagal gaminamų imunoglobulinų izotipą.

Hibridomos 7A5, 5E11, 5C5 ir 2E6 skiriasi nuo kitų aprašytų analogų – hibridomų,
15 gaminančių MA prieš hantavirusų nukleokapsidės baltymą – pagal tą požymį, kad imunizacijai buvo naudojamos VPD, turinčios įterptą hantaviruso nukleokapsidės fragmentą: N-galinę 120 aminorūgščių (a.r) seką :

MSDLTDIQEDITRHEQQLVVARQKLKDAEKAVEMYPDDVNKNTLQARQQTVSALEDKLADFKRR
MADAVSRKKMDTKPTDPTGIEPDDHLKERSSLRVGNVLDVNAIDIEEPSGQTADWY.

Aukščiau aprašytieji analogai skiriasi nuo hibridomų 7A5, 5E11, 5C5, 2E6 tuo, kad
20 imunizacijai buvo naudojami arba pilno ilgio rekombinantiniai hantavirusų nukleokapsidės baltymai, arba virusai, bet ne VPD, turinčios įterptą hantaviruso nukleokapsidės fragmentą. Analogo hibridoma E5/G6 dar skiriasi tuo, kad ji gamina kito specifiskumo MA (atpažįstančius aminorūgščių seką 165-173), nei hibridomos 7A5,
25 5E11, 5C5, 2E6 (atpažįstančius aminorūgščių seką 1-120).

Naujų monokloninių antikūnų gavimo būdą ir naujų hibridomų savybes iliustruoja informacija, pateikta 1-4 pavyzdžiuose, 1-2 lentelėse ir Fig. 1-3.

Fig atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniais baltymais VP1 ir VP1/Muc, naudojant hibridomų 2B12 ir 14G2 gaminamus MA.

30 Fig.2 iliustruoja chimerinio baltymo VP1/VR120 imunogeniškumą.

Fig.3 iliustruoja hibridomų 7A5, 5E11, 5C5 ir 2E6 gaminamų MA funkcinį aktyvumą – sugebėjimą atpažinti pilno ilgio hantaviruso nukleokapsidės baltymą.

Naujų monokloninių antikūnų gavimo būdas, jų savybės detaliau aprašomi toliau pateiktuose pavyzdžiuose.

5 1 pavyzdys

Chimerinio baltymo, turinčio įterptą Muc1 epitopą, panaudojimas monokloninių antikūnų prieš Muc1 epitopą gavimui

BALB/c linijos pelės buvo imunizuojamos mielėse ekspresuotu išgrynintu rekombinantiniu chimeriniu baltymu: žiurkėno poliomos viruso pagrindiniu kapsidės baltymu VP1 (HaPyV-VP1), turinčiu įterptus Muc1 epitopus 1 ir 4 pozicijose (VP1/Muc). HaPyV-VP1 (VP1) baltymo ekspresija mielėse ir jo savybės buvo aprašytos anksčiau [Gedvilaitė A., Frommel C., Sasnauskas K., et al., Virology. 2000, v. 273, n. 1, p. 21-35]. Pelės imunizuojamos, suleidžiant 50 µg VP1/Muc antigeno su pilnu Freund'o adjuvantu po oda. Praėjus 4 savaitėms po pirmosios imunizacijos, tuo pat būdu pelės buvo imunizuojamos pakartotinai, suleidžiant 50 µg VP1/Muc antigeno su nepilnu Freund'o adjuvantu. Dar po 4 savaičių pelės imunizuojamos, suleidžiant 50 µg VP1/Muc antigeno be adjuvanto. Imunizacijų metu tikrinamas Muc1 epitopui specifiskų antikūnų titras imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Praėjus 3 dienoms po paskutinės imunizacijos, atliekama hibridizacija.

Hibridizacijai buvo naudojamos imunizuotos pelės blužnies ląstelės ir pelių mielomos ląstelės Sp 2/0, neturinčios fermento hipoksantin-guanin-fosforiboziltransferazės, neaugančios selektyvioje hipoksantino-aminopterino-timidino (HAT) terpėje (10^{-4} M hipoksantino, $1,6 \times 10^{-5}$ M timidino, 4×10^{-7} M aminopterino) ir negaminančios imunoglobulinų ar jų grandinių. Prieš hibridizaciją ląstelės turi būti logaritminėje augimo fazėje. Hibridizacija atliekama, 2 minutes veikiant ląsteles 50% polietilenglikolio (PEG-4000) tirpalu Dubecco modifikuotoje Eagl'o terpėje (DMEM) su 10% dimetilsulfoksido (DMSO). Mielomos ir blužnies ląstelių santykis hibridizacijos metu – 1:5. Po hibridizacijos ląstelės buvo atplaunamos beserumine DMEM terpe, suspenduojamos selektyvioje HAT terpėje ir išsėjamos į plokšteles (po 5×10^5 ląstelių į šulinėlį).

Hibridiniai klonai pasirodo 5-10 dieną po hibridizacijos. Testuojant terpę netiesioginės IFA metodu, nustatoma, ar klonai gamina antikūnus prieš VP1/Muc. Kas 4-5 dienos pakeičiama pusė ląstelių augimo terpės. Pirmą kartą HAT terpė keičiama į hipoksantino-timidino (HT) terpę, turinčią 10^{-4} M hipoksantino ir $1,6 \times 10^{-4}$ M timidino. Vėliau HT

terpė palaipsniui keičiama į įprastą augimo terpę. Hibridiniai klonai, gaminantys antikūnus prieš VP1/Muc, buvo klonuojami ribinio praskiedimo metodu. Klonai pasirodo po 4-7 dienų. Jie testuojami netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Atrinkti klonai padauginami ir toliau auginami kultūroje arba užšaldomi ir saugomi skystame azote.

Buvo gauti 7 hibridomų klonai, produkuojantys monokloninius antikūnus (MA) prieš chimerinį baltymą VP1/Muc. Buvo nustatyta, kad 2 iš jų yra specifiški Muc1 peptidui, 5 – specifiški HaPyV-VP1 (baltymui-nešėjui).

Hibridomos, produkuojančios MA prieš Muc1 peptidą, buvo pavadintos 12B2 ir 14G2.

Joms suteikti atitinkami deponavimo numeriai: 12B2 – M05101, 14G2 – M0502.

Kontrolinė grupė BALB/c pelių buvo imunizuojama sintetiniu Muc1 peptidu, chemiškai prijungtu prie jaučio serumo albumino (BSA/Muc), naudojant gliutaro aldehydą. Pelės buvo imunizuojamos pagal aukščiau aprašytą schemą. Imunizacijų metu tikrinamas Muc1 specifinių antikūnų titras.

Buvo nustatyta, kad BSA/Muc nesukėlė jokio imuninio atsako prieš Muc1 peptidą. Todėl šių pelių blužnies ląstelės nebuvo naudojamos hibridizacijai ir monokloninių antikūnų gavimui.

2 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų, gautų prieš Muc1 epitopą, specifškumo ir izotipų nustatymas.

Hibridomų 12B2 ir 14G2 gaminamų antikūnų specifškumas buvo nustatomas imunofermentinės analizės bei imunoblotingo metodais. Imunoglobulinų izotipai buvo nustatomi imunofermentinės analizės metodu, naudojant izotipų nustatymo rinkinį [Sigma, JAV].

Šiais metodais buvo nustatyta, kad gautieji monokloniniai antikūnai yra IgG izotipo, IgG1 subtipo ir atpažįsta chimerinį baltymą VP1/Muc bei sintetinį peptidą Muc1, bet nereaguoja su VP1 (baltymu-nešėju). Tai rodo, kad jie yra specifiški Muc1 epitopui. Gauti rezultatai yra pateikti 1 lentelėje ir Fig. 1.

MA specifškumą iliustruoja 1 lentelė, kurioje pateikiami duomenys apie hibridomų 12B2 ir 14G2 gaminamų MA specifškumą ir poklasių:

1 lentelė

Hibridomų klonas	Subtipas (poklasė)	Reakcija su:		
		HaPyV-VP1	VP1/Muc	Sintetiniu peptidu Muc1
12B2	IgG1	-	+	+
14G2	IgG1	-	+	+

Fig. 1 atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniais baltymais VP1 ir VP1/Muc, naudojant hibridomų 2B12 ir 14G2 gaminamus MA. Palyginimui pateikiamas
 5 imunoblotingo vaizdas, gautas su tais pačiais baltymais, naudojant MA prieš baltymą VP1. Virš imunoblotingo vaizdo nurodyti MA pavadinimai:

12B2 – prieš baltymą VP1/Muc;

14G2 – prieš baltymą VP1/Muc;

9F11 - prieš baltymą VP1,

10 6D11 - prieš baltymą VP1.

1 takelis - baltymas VP1; 2 takelis – baltymas VP1/Muc.

Kaip parodyta imunoblotingo metodu (Fig.1), hibridomų 12B2 ir 14G2 gaminami MA specifiskai jungiasi prie baltymo VP1/Muc1, bet nereaguoja su baltymu VP1. Kontrolei buvo naudojami MA 9F11 ir 6D11, kurie yra specifiski baltymui VP1. Jie jungiasi prie
 15 abiejų šių antigenų: VP1 ir VP1/Muc.

3 pavyzdys.

Chimerinio baltymo, turinčio įterptą hantaviruso nukleokapsidės baltymo fragmentą, panaudojimas monokloninių antikūnų prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą gavimui
 20

BALB/c linijos pelės imunizuojamos mielėse ekspresuotais išgrynintais rekombinantiniais chimeriniais baltymais: HaPyV-VP1, turinčiais įterptą 120 aminorūgščių ilgio hantaviruso *Vranica* nukleokapsidės baltymo fragmentą arba 1, arba 4 pozicijoje (VP1/VR120). Šių baltymų ekspresija mielėse ir jų savybės buvo aprašytos
 25 anksčiau [A.Gedvilaite, A.Zvirbliene, J.Staniulis et al, Viral Immunol. 2004, 17(1):51-68].

Pelės BALB/c buvo imunizuojamos 3 kartus, po to buvo atliekama hibridizacija. Visos procedūros atliekamos panašiai, kaip aprašyta 1 pavyzdyje, tik naudojamas ne VP1/Muc baltymas, o VP1/VR120 baltymas. Imunizacijų metu imunizuotų pelių kraujo serume IFA

metodu tikrinamas specifinių antikūnų titras (lygis), t.y., nustatoma, ar susidaro IgG klasės antikūnai prieš įterptąjį hantaviruso nukleokapsidės (HN) baltymo fragmentą.

Fig.2 iliustruoja chimerinio baltymo VP1/VR120 imunogeniškumą. Pateikiami IgG klasės antikūnų titrai imunizuotų pelių kraujo serume po 3-osios imunizacijos. Titrai buvo

5 nustatyti IFA metodu, naudojant šiuos antigenus:

1 – VP1/VR120;

2 – VP1;

3- hantaviruso nukleokapsidės baltymas.

10 Buvo nustatyta, kad antikūnų prieš HN titras yra žymiai aukštesnis, nei prieš baltymą VP1 (Fig. 2).

Atlikus hibridizaciją, buvo gauti 4 hibridomų klonai, gaminantys MA prieš chimerinį baltymą VP1/VR120. Buvo nustatyta, kad visi jie reaguoja su VP1/VR120, bet nereaguoja su VP1 (baltymu-nešėju). Tai rodo, kad visos gautos hibridomos yra specifinės HN baltymo fragmentui, įterptam į chimerinį baltymą VP1/VR120.

15 Taigi, galima teigti, kad HN fragmento įterpimas į VPD struktūrą žymiai padidino šio fragmento imunogeniškumą. Aukštas antikūnų prieš HN titras imunizuotų pelių kraujo serume rodo, kad įterptasis 120 aminorūgščių ilgio fragmentas yra chimerinio baltymo paviršiuje ir todėl geriau aktyvuoja B ląsteles, nei baltymas-nešėjas VP1. Hibridomų technologija yra paremta tuo, kad gaunami ir atrenkami B ląstelių ir vėžinių ląstelių
20 hibridai. Taigi, kuo efektyviau antigenas aktyvuoja B ląsteles, tuo daugiau gaunama hibridomų, gaminančių MA prieš tą antigeną. Tuo galima paaiškinti, kad buvo gautos vien hibridomos, gaminančios MA prieš įterptąjį HN fragmentą, bet ne prieš VP1 (baltymą-nešėją). Šie rezultatai rodo, kad baltymo fragmento įterpimas į VPD yra pranašesnis hibridomų gavimo būdas, nei anksčiau aprašytieji būdai, pavyzdžiui, peptidų
25 prijungimas prie baltymų-nešėjų cheminiais metodais.

Hibridomos, produkuojančios monokloninius antikūnus prieš HN, buvo pavadintos 7A5, 5E11, 5C5, 2E6. Joms suteikti atitinkami deponavimo numeriai: HN0501, HN0502, HN0503, HN0504.

30 4 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų, gautų prieš HN, specifiskumo ir izotipų nustatymas.

Gautų hibridomų produkuojamų antikūnų specifiskumas ištiriamas imunofermentinės analizės bei imunoblotingo metodais, naudojant rekombinantinius hantavirusų baltymus.

Imunoglobulinų izotipai nustatomi imunofermentinės analizės metodu, kaip aprašyta 2 pavyzdyje. Šiais metodais buvo nustatyta, kad visi gautieji MA yra IgG izotipo, IgG1, IgG2a ir IgG2b poklasių.

2 lentelėje pateikiami duomenys apie hibridomų 7A5, 5E11, 5C5 ir 2E6 gaminamų MA specifiškumą ir poklasių.

2 lentelė

Hibridomų klonas	Subtipas (poklasė)	Reakcija su:		
		HaPyV-VP1	HN	VP1/VR120
7A5	IgG1	-	+	+
5E11	IgG1	-	+	+
5C5	IgG2a	-	+	+
2E6	IgG2b	-	+	+

Fig.3 iliustruoja hibridomų 7A5, 5E11, 5C5 ir 2E6 gaminamų MA funkcinį aktyvumą – sugebėjimą atpažinti pilno ilgio hantaviruso nukleokapsidės baltymą. Pateikiamas imunoblotingo vaizdas, gautas, naudojant hibridomos 7A5 gaminamus MA.

1 - 9 takeliai – skirtingų hantavirusų nukleokapsidės baltymai.

Imunoblotingo metodu buvo nustatyta, kad visi MA atpažįsta chimerinį baltymą VP1/VR120 ir įvairių hantavirusų nukleokapsidės baltymus, ekspresuotus mielėse. Tai rodo, kad jie yra funkciškai aktyvūs ir reaguoja su pilno ilgio HN baltymais. Todėl šie MA galėtų būti taikomi HN baltymų nustatymui biotechnologijoje arba diagnostikoje.

Tokiu būdu:

1) Kai imunizacijai ir hibridomų gavimui buvo naudojamos VPD su trumpu įterptu fragmentu (Muc 1 epitopas – 9 a.r. ilgio) – gautos 2 hibridomos, gaminančias MA prieš šį epitopą ir 5 hibridomas, gaminančias MA prieš HaPyV-VP1 (baltymą nešėją). T.y., prieš įterptąjį fragmentą gauta daugiau hibridomų, nei buvo pagrindo tikėtis iš Muc1 epitopo ir VP1 nešėjo dydžių santykio (Muc1 epitopas – 9 a.r., VP1 – apie 380 a.r.);

2) Kai imunizacijai ir hibridomų gavimui buvo naudojamos VPD su ilgesniu įterptu fragmentu (HN – 120 a.r. ilgio) – gautos vien tik hibridomos prieš šį įterptąjį fragmentą, bet negauta nei vienos hibridomos prieš VP1 nešėją. T.y., prieš įterptąjį fragmentą (kaip ir pirmuoju atveju) gauta daugiau hibridomų, nei galima buvo tikėtis iš Muc1 epitopo ir VP1 nešėjo dydžių santykio (HN fragmentas - 120 a.r., VP1 – apie 380 a.r.).

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS:

1. Monokloninių antikūnų gavimo būdas, apimantis specialios linijos pelių imunizaciją, imunizacijos pakartojimą bent vieną kartą, pelių blužnies ląstelių hibridizaciją, hibridinių klonų dauginimą ir auginimą besiskiriantis tuo, kad imunizaciją atlieka, 5 injekuojant pelėms rekombinantinių chimerinių virusų baltymų su įterptais kito baltymo fragmentais, galinčių formuoti į virusus panašias daleles, tirpalą.
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad konkrečios paskirties monokloninių antikūnų gavimui naudoja į virusus panašias daleles, turinčias baltymų, prieš kuriuos 10 siekiama gauti monokloninius antikūnus, fragmentus, įterptus nustatytose į virusą panašios dalelės struktūros vietose.
3. Hibridoma 12B2, deponavimo numeris M0501, gaminanti MA prieš Muc1 epitopą (9 aminorūgščių seką STAPPVHNV), gauta būdu, aprašytu 1-2 punktuose. 15
4. Hibridoma 14G2, deponavimo numeris M0502, gaminanti MA prieš Muc1 epitopą (9 aminorūgščių seką STAPPVHNV), gauta būdu, aprašytu 1-2 punktuose.
- 20 5. Hibridoma 7A5, deponavimo numeris HN0501, gaminanti MA prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą (N-galinę 120 aminorūgščių seką) gauta būdu, aprašytu 1-2 punktuose.
- 25 6. Hibridoma 5E11, deponavimo numeris HN0502, gaminanti MA prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą (N-galinę 120 aminorūgščių seką), gauta būdu, aprašytu 1-2 punktuose.
- 30 7. Hibridoma 5C5, deponavimo numeris HN0503, gaminanti MA prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą (N-galinę 120 aminorūgščių seką), gauta būdu, aprašytu 1-2 punktuose.

8. Hibridoma 2E6, deponavimo numeris HN0504, gaminanti MA prieš hantaviruso nukleokapsidės baltymą (N-galinę 120 aminorūgščių seką), gauta būdu, aprašytu 1-2 punktuose.

5 9. Rekombinantinių chimerinių į virusus panašių dalelių su įterptais kitų baltymų fragmentais panaudojimas kaip imunogenų hibridomų pagal 3-8 punktus gavimui.

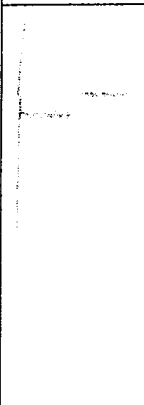
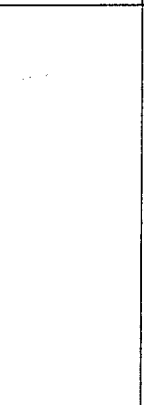
9F11		6D11		12B2		14G2	
							
1	2	1	2	2	1	2	1

Fig.1

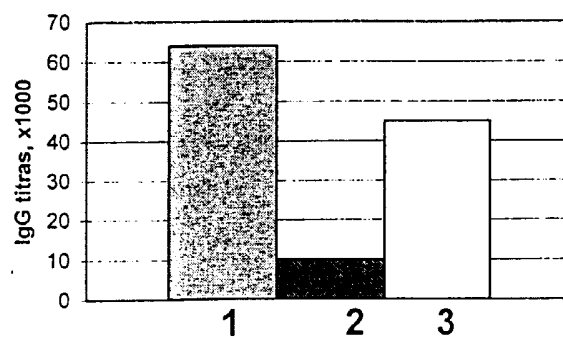


Fig.2

LT 5414 B

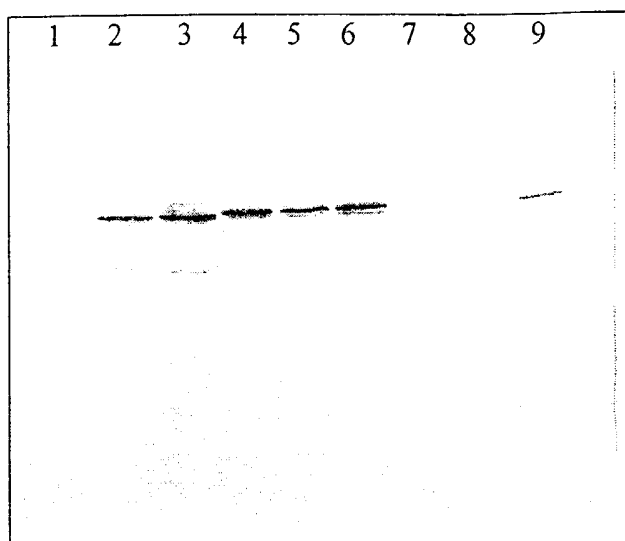


Fig.3.