

(19)



(10) **LT 5705 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5705**

(51) Int. Cl. (2006): **C07K 16/12**
C12N 5/12
A61K 39/395
G01N 33/573

(21) Paraiškos numeris: **2009 012**

(22) Paraiškos padavimo data: **2009 02 23**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2010 08 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2011 01 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
Indrė Kučinskaitė-Kodzė, LT
Milda PLEČKAITYTĖ, LT
Gintautas ŽVIRBLIS, LT

(73) Patent savininkas:

UAB PROFARMA, V, Graičiūno g. 8, LT-02241 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis”,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Monokloniniai antikūnai prieš vaginoliziną

(57) Referatas:

Išradimas apibūdina naujus monokloninius antikūnus, specifiskus *Gardnerella vaginalis* vaginoliziniui ir neutralizuojančius jo citolitinį aktyvumą. Sukurtieji monokloniniai antikūnai gali būti taikomi *Gardnerella vaginalis* infekcijos diagnostikai.

Išradime apibūdintos naujos hibridomos 9B4, 23A2 ir 3G1, gaminančios neutralizuojančius monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną. Hibridomų 9B4 ir 23A2 gaminami antikūnai pasižymi stipresniu neutralizuojančiu veikimu, nei hibridomos 3G1 gaminami antikūnai. Panaudojant hibridomų 9B4 ir 23A2 genetinę medžiagą, gali būti sukurti biofarmacinės paskirties antikūnai, kurie gali būti taikomi profilaktiniais ir terapiniais tikslais.

Šis išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai. Jo esmė - naujų monokloninių
5 antikūnų prieš vaginoliziną, kurie neutralizuoja vaginolizino biologinį aktyvumą, sukūrimas.

Nuo cholesterolio priklausantys citolizinais priklauso didelei poras formuojančiai toksinų
šeimai, kuriuos gamina daugiau negu 20 rūšių mikroorganizmų iš *Clostridium*,
Streptococcus, *Listeria*, *Arcanobacterium*, *Bacillus* ir kitų genčių. Šie toksinai (dažnai
10 vadinami citolizinais ar hemolizinais) susiję su dermatologinėmis infekcijomis
(streptolizinas O, piolizinas), ūmia karštine, reumatine karštine, faringitu (streptolizinas O),
plaučių infekcijomis (pneumolizinas), listerioze (listeriolizinas O), dalyvauja įvairių
pneumokokinių sindromų patogenezėje (pneumolizinas) bei pirminiame audinių pažeidimo
etape, kuris vėliau vystosi į dujinę gangreną (perfringolizinas O). Manoma, jog šie toksinai
15 rišasi su šeimininkų ląstelių membranose esančiu cholesteroliu, oligomerizuojasi, įsiterpia į
membranas, ir membrana tokiu būdu pažeidžiama. Be to, šie citolizinais dalyvauja
procesuose, susijusiuose su citokinų sekrecijos ir kitų imuninės sistemos moduliatorių
indukcija. Taigi, šie citolizinais yra vieni pagrindinių virulentiškumo faktorių, vystantis
infekcijai, sukeltai minėtų bakterijų [Tweten R. K. Infect. Immun., 2005, 73, pp. 6199–
20 6209].

Vaginolizinas (VLY) yra baltyminis toksinas, kurį gamina bakterijos *Gardnerella vaginalis*.
Šis baltymas priskiriamas nuo cholesterolio priklausančių citolizinių šeimai. Vaginolizino
toksinis poveikis pasireiškia tuo, kad jis, kaip ir kiti šios šeimos toksinai suformuoja poras
ląstelės membranoje ir lizuoja žmogaus ląsteles.
25 *Gardnerella vaginalis* yra žinomas kaip bakterinės vaginozės (BV) sukėlėjas, o
vaginolizinas yra vienas pagrindinių šios bakterijos virulentiškumo faktorių [Cauci S, Monte
M, Ropele C et al., Mol Microbiol, 1993, 9, pp. 53-58]. BV yra dažnai pasitaikantis
susirgimas, susijęs su daugeliu sveikatos problemų, pvz., priešlaikiniu gimdymu, o tai susiję
su mažesniu naujagimių svoriu, įtakojančiu naujagimių mirštamumą ir sergamumą. BV taip
30 pat susijusi su dubens organų uždegimais, pogimdyminiais endometritais ir kitais
infekciniais susirgimais. Taigi, vaginolizino neutralizacija naudojant antikūnus gali būti
efektyvus terapijos būdas, kovojant su *Gardnerella vaginalis* infekcijos patogeniniu
poveikiu.

- 1993 m. aprašytas apsaugančių, toksinus neutralizuojančių žmogaus monokloninių antikūnų sukūrimas. Buvo pagaminta keletas monokloninių antikūnų prieš stabligės toksiną ir buvo stebėtas jų apsaugojamasis efektas [Lang et al., J. Immunol. 1993, 151, pp. 466-472]. Tačiau skiriant šių toksinų kombinacijas, buvo pastebėtas sinergistinis efektas. Toks pats efektas
- 5 buvo nustatytas, neutralizuojant botulizmo toksiną. Antikūnai prieš botulizmo toksiną buvo gauti, panaudojant fagų eksponavimo (*angl. phage-display*) bibliotekas, pagamintas iš žmogaus ar imunizuotos pelės ląstelių DNR [Brekke and Sandlie, Nat.Rev. Drug Discov. 2002, 2, pp. 52-62]. Neseniai buvo gauti pelės monokloniniai antikūnai prieš pneumoliziną ir patikrintas jų efektyvumas, panaudojant gyvūnų modelius [Garsia-Suarez et al., Infect.
- 10 Immun. 2004, 72, pp. 4534-4540]. Ispanų mokslininkų grupė paskelbė, jog pagamino pelės neutralizuojančius antikūnus PLY5, kurie atpažįsta daugelį citolizinių. Parodyta, jog pastarieji antikūnai gauti prieš specifinį epitopą – undekapeptidą. Šis antikūnas inhibuoja toksinų susirišimą su ląstelės membranomis, nes epitopas tampa „neprieinamas“ [Jacobs et al., FEBS Lett. 1999, 459, pp. 463-466].
- 15 Antikūnai tapo patrauklūs kaip biofarmaciniai preparatai, kadangi įvyko žymūs technologiniai poslinkiai antikūnų konstravimo, jų humanizavimo srityje. Pastaruoju metu buvo labai supaprastintos tokios technologijos, kaip genų, koduojančių žmogaus imunoglobulinų variabiliąsias sritis, klonavimas, jų ekspresija *E. coli* ir fagų eksponavimo panaudojimas imunoglobulinų variabiliųjų rajonų selekcijai. Maynard ir kolegos pagamino
- 20 didelio afiniškumo antikūnus prieš *Bacillus anthracis* [Maynard et al., Nature Biotechnol. 2002, 30, pp. 597-601]. Šie antikūnai buvo sudaryti iš fragmentų, gautų iš pelės imunoglobulino (IgG) variabiliosios srities ir ekspresuotų *E. coli* kaip viengrandžiai Fv fragmentai (scFv). Jei scFv buvo leidžiami pelei, prieš juodligės toksino injekciją, tai buvo stebėtas apsauginis efektas prieš šį toksiną. Neutralizuojantys žmogaus antikūnai prieš Shiga
- 25 toksiną I buvo neseniai gauti, panaudojant transgenines peles [Mukherjee et al., Infect. Immun. 2002, 70, pp. 5896-5899]. Dešimt skirtingų IgM ir IgG1 klasės antikūnų, kurie buvo specifiškai skirtingiems subvienetams, efektyviai neutralizavo toksiną. Taip pat buvo sukurtas viengrandis scFv antikūnas, kuris neutralizavo skorpiono nuodų toksiną II [Mousli et.al., FEBS Lett. 1999, 442 pp. 183-188].
- 30 Naudojant genų inžinerijos metodus, buvo gautas rekombinantinis vaginoliziņas, kuris buvo panaudotas šio toksino veikimo mechanizmo tyrimams [Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KLT et al., J Bacteriol, 2008, 190, pp. 3896-3903].

- Yra aprašyti monokloniniai antikūnai prieš bakterijų *Streptococcus pneumoniae* toksiną pneumoliziną (PLY) [EP0687688, publ. 1995; Toyos JR, Mendez FJ, Aparico JF et al., Infect Immun, 1996, 64, pp.480-484; Garcia-Suarez MM, Cima-Cabal MD, Florez N et al., Infect Immun, 2004, 72, pp. 4534-4540]. Šis toksinas, kaip ir vaginolizinas, yra nuo
- 5 cholesterolio priklausančių citolizinių šeimos narys, tačiau jis skiriasi nuo vaginolizino pagal struktūrą, veikimo mechanizmą ir kitas savybes. Buvo sukurti 9 monokloniniai antikūnai prieš pneumoliziną (PLY-1 – PLY-9), iš kurių 3 pasižymėjo neutralizuojančiu aktyvumu, t.y. šie antikūnai blokavo pneumolizino biologinį veikimą tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Naudojant pelių modelį buvo parodyta, kad 2 iš minėtų neutralizuojančių antikūnų (PLY-4 ir PLY-7)
- 10 apsaugojo peles nuo bakteriemijos ir plaučių pažeidimo *Streptococcus pneumoniae* infekcijos metu bei neutralizavo išgryninto pneumolizino letalų toksinį poveikį. Aprašyti PLY-1 – PLY-9 analogai – monokloniniai antikūnai 26-5F12, 26-23C2, 22-6E6 prieš pneumoliziną, kurie neutralizavo pneumolizino hemolitinį aktyvumą [WO2006021210, publ. 2006].
- 15 Aprašyti monokloniniai antikūnai prieš streptoliziną (SLO) ir jo variantus [WO9305152, publ. 1993].
- Literatūroje taip pat aprašyti monokloniniai antikūnai prieš bakterijų *Listeria monocytogenes* toksiną listerioliziną (LLO) [Edelson TB, Cossart P, Unanue ER, J Immunol, 1999, 163, pp. 4087-4890; Edelson TB, Unanue ER, Immunity, 14, pp. 503-512]. Listeriolizinas yra
- 20 toksinas, formuojantis poras ląstelės membranoje. Tai pagrindinis bakterijų *Listeria monocytogenes* virulentiškumo faktorius, kurio dėka šios bakterijos išvengia fagocitozės, t.y. šeimininko imuninio atsako. Buvo sukurti monokloniniai antikūnai A4-8 prieš listerioliziną, kurie neutralizavo jo biologinį veikimą *in vitro* (porų formavimą ląstelės membranoje) ir *in vivo*. Naudojant pelių modelį buvo parodyta, kad antikūnai A4-8 padidino pelių atsparumą
- 25 *Listeria monocytogenes* infekcijai, stabdė šių bakterijų replikaciją ir apsaugojo nuo letalios infekcijos.
- Aprašytieji pavyzdžiai iliustruoja, kad neutralizuojantys monokloniniai antikūnai prieš bakterijų citolizinus gali turėti potencialų terapinį pritaikymą, gydant pavojingas bakterines infekcijas.
- 30 Literatūroje nėra rasta duomenų apie monokloninius antikūnus prieš bakterijų *Gardnerella vaginalis* toksiną vaginoliziną. Aprašytieji analogai buvo sukurti prieš kitus toksinus, kurie priskiriami tai pačiai poras formuojančių citolizinių šeimai, tačiau funkciškai ir struktūriškai skiriasi nuo vaginolizino.

Išradimo uždavinys buvo sukurti efektyvią priemonę, skirtą vaginolizino nustatymui bei vaginolizino citolitinio aktyvumo blokavimui. Problema gali būti išspręsta, gavus naujus monokloninius antikūnus prieš bakterijų *Gardnerella vaginalis* toksiną vaginoliziną, kurie reaguotų su natyviu vaginolizinu ir neutralizuotų jo sugebėjimą sukelti ląstelių lizę. Tokie antikūnai galėtų būti panaudoti diagnostiniais tikslais, o jų pagrindu sukurti biofarmaciniai preparatai - profilaktiniais bei terapiniais tikslais.

Išradime siūlomos sukurtos naujos 3 hibridomų linijos, produkuojančios monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną. Atlikti tyrimai parodė, kad sukurtieji monokloniniai antikūnai reaguoja tiek su rekombinantiniu vaginolizinu sintetinamu *E.coli* bakterijose, tiek su natyviu vaginolizinu iš bakterijų *Gardnerella vaginalis*. Taip pat buvo parodyta, kad sukurtieji monokloniniai antikūnai neutralizuoja vaginolizino biologinį veikimą *in vitro* – blokuoja vaginolizino sukeltą žmogaus eritrocitų lizę. Du iš naujai sukurtų monokloninių antikūnų (9B4 ir 23A2) pasižymėjo stipresniu neutralizuojančiu poveikiu, vienas – silpnėsiu (3G1). Šiame išradime siūlomi monokloniniai antikūnai yra nauji ir skiriasi nuo analogų iš kitų šaltinių bei aukščiau aprašytų monokloninių antikūnų.

Siekiant sukurti naujus monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną, buvo panaudotas rekombinantinis vaginolizinas ir atliktos įprastos, žinomos šios srities specialistams procedūros, būtent:

- 1) atliekama imunizacija – rekombinantinis vaginolizinas (antigenas) buvo suleidžamas BALB/c linijos pelėms po oda. Prieš injekciją antigeno tirpalas buvo lygiu tūriu sumaišomas su pilnu Freund'o adjuvantu;
- 2) atliekama pakartotinė imunizacija – po 4 savaičių pelėms dar kartą buvo suleidžiama tokia pat antigeno dozė po oda, prieš tai antigeno tirpalą sumaišius su nepilnu Freund'o adjuvantu;
- 3) dar po 4 savaičių buvo suleidžiama tokia pat antigeno dozė be adjuvanto. Imunizacijų metu buvo keletą kartų tikrinama, ar imunizuotų pelių kraujo serume atsirado antikūnų prieš antigeną. Patikrinimui buvo naudojamas žinomas metodas – imunofermentinė analizė (IFA);
- 4) praėjus 3 dienoms po trečiosios imunizacijos, 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 žinomą procedūrą, naudojamą hibridomų gavimui [Kohler, Milstein, Nature 1975; 256:495-497].

5) gavus hibridinių ląstelių klonus (hibridomas) buvo tikrinamas jų specifiškumas, t.y. nustatoma, ar jie gamina antikūnus prieš vaginoliziną. Tam buvo naudojamas IFA metodas;

6) gautos hibridomos buvo charakterizuojamos pagal įvairius požymius:

- nustatant jų gaminamų monokloninių antikūnų izotipą;
- ištiriant antikūnų specifiškumą IFA ir imunoblotingo metodais,

7) identifikavus hibridomas, kurios gamina monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną, jos buvo klonuojamos, padauginomos ir užšaldomos tolesniam saugojimui;

8) hibridomų gaminami monokloniniai antikūnai buvo charakterizuojami anksčiau aprašytais būdais:

- IFA bei imunoblotingu, naudojant kaip antigeną rekombinantinį vaginoliziną,
- imunoblotingu, naudojant bakterijų *Gardnerella vaginalis* lizatą;
- tikrinamas monokloninių antikūnų neutralizuojantis poveikis, naudojant žmogaus eritrocitus.

Taigi, atlikus pelių BALB/c imunizacijas rekombinantiniu vaginolizinu ir suliejus imunizuotų pelių blužnies ląsteles su mielomos ląstelėmis, buvo gautos hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną. Ištyrus gautų monokloninių antikūnų savybes, buvo nustatyta, kad jie reaguoja su natyviu vaginolizinu iš bakterijų *Gardnerella vaginalis* ir neutralizuoja vaginolizino citolitinį veikimą *in vitro*.

Aprašytu būdu buvo gautos ir ištirtos 3 naujos hibridomos, kurios deponuotos Biotechnologijos instituto (Vilnius) Imunologijos ir ląstelės biologijos laboratorijoje:

- 1) Hibridoma 9B4, deponavimo numeris VLY001, kuri gamina IgG1 poklasio (subtipo) monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną;
- 2) Hibridoma 23A2, deponavimo numeris VLY002, kuri gamina IgG1 poklasio (subtipo) monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną;
- 3) Hibridoma 3G1, deponavimo numeris VLY003, kuri gamina IgG1 poklasio (subtipo) monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną.

Bet kuri iš minėtų naujų hibridomų - 9B4, 23A2 ir 3G1 - produkuoja monokloninį antikūną prieš vaginoliziną ir yra šio išradimo objektas.

Hibridomas 9B4, 23A2 ir 3G1 apibūdina šie požymiai.

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

- 5 Lastelių kultūros kilmė. Hibridomas gautos, suliejus imunizuotų BALB/c linijos pelių (*Mus.musculus*) blužnies ląsteles su pelės (*Mus.musculus*) mielomos ląstelių linija Sp2/0.

- Lastelių 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. Hibridomas auginamos stiklo arba plastiko induose, skirtuose ląstelių kultūroms. Ląstelės persėjamos kas 3-4 dienos, persėjimo dozė – 50-100 tūkstančių ląstelių mililitre terpės. Hibridomas auginamos inkubatoriuje, kurio atmosferoje yra 5% CO₂, esant 37°C temperatūrai. Ilgalaikiam saugojimui hibridomas užšaldomos embrioniniame serume su 10% DMSO ir laikomos skystame azote. Užšaldymo sąlygos: 1×10⁶ - 2×10⁶ ląstelių mililitre, temperatūros režimas – 1°C per minutę iki -70°C. Po paros ampulės su ląstelėmis perkeliama į skystą azotą. Kultūrų atgaivinimui ampulės atšildomos 37°C temperatūros vandens vonioje. Ląstelių gyvybingumas po atšildymo – 70-80%.

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

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

- Produktų charakteristika. Hibridomas 9B4, 3G1 ir 23A2 gamina IgG klasės, IgG1 poklasio monokloninius antikūnus, specifiskus vaginoliziniui iš bakterijų *Gardnerella vaginalis*. Hibridomas 9B4 gaminami monokloniniai antikūnai visiškai neutralizuoja vaginolizino biologinį aktyvumą, esant reakcijos mišinyje 5 ng/ml vaginolizino ir 20 ng/ml monokloninių antikūnų. Hibridomas 23A2 gaminami monokloniniai antikūnai visiškai neutralizuoja vaginolizino biologinį aktyvumą, esant reakcijos mišinyje 5 ng/ml vaginolizino ir 200 ng/ml monokloninių antikūnų. Hibridomas 3G1 gaminami monokloniniai antikūnai visiškai neutralizuoja vaginolizino biologinį aktyvumą, esant reakcijos mišinyje 5 ng/ml vaginolizino ir 1000 ng/ml monokloninių antikūnų.

- 30 Hibridomų 9B4, 3G1 ir 23A2 gaminami monokloniniai antikūnai skiriasi nuo aprašytų analogų – monokloninių antikūnų prieš kitus bakterijų citolizinus - pagal tą požymį, kad jie yra specifiski vaginoliziniui (VLY), kuris funkciškai ir struktūriškai skiriasi nuo kitų citolizinių. VLY skiriasi nuo kitų citolizinių pagal šiuos požymius:

- 1) Baltymo pirminę struktūrą (aminorūgščių seką);
- 2) Kilmę – VLY yra gaminamas bakterijų *Gardnerella vaginalis*,
- 3) Biologinį veikimą – VLY lizuoja tik žmogaus eritrocitus;
- 4) Atpažįstamus ląstelių paviršiaus receptorius - VLY jungiasi prie žmogaus eritrocitų per CD59 molekulę.

Tyrimai parodė, kad hibridomų 9B4, 3G1 ir 23A2 gaminami monokloniniai antikūnai atpažįsta aminorūgščių seką SEQ ID: Nr.1:

```

MNNTKFYRNAAMLLLAGATIIPQCLAAPAMAAPAAKDSEPTASC
AAKKDSLNNYLWDLQYDKTNILARHGETIDNKFSSDSFNKGDEFVVEHQKNITNTT
SNLSVTSANDDRVYPGALFRADQNLMDNMPSLISANRAPITLSVDLPGFHGGESAVTV
QRPTKSSVTSAVNGLVSKWNAQYAASHHVAARMQYDSASAQSMSQLKAKFGADFAKIG
VPLKIDFDAVHKGEKQTQIVNFKQTYTTSVDAPDSPADFFAPCTTPESLKS RGVDSK
RPPVYVSNVAYGRSMYVKFDTRSKSTDFQAAVEAAIKGVEIKPNTFHRILQNTSVTA
VILGGSANGAAKVITGNVDTLKALIQEGANLSTSSPAVPIAYTTSFVKDNEVATLQTN
SDYVETKVSSYRDGYLTLDHRGAYVARYYYIWDEYGTIDGTPYVRSRAWEGNGKYRT
AHFNTTIQFKGNVHNLRIKLVEKTGLVWEPWRTVYDRSDLPLVRQRTIKNWGTTWPR
VAETVKND

```

Ši aminorūgščių seka atitinka vaginolizino iš *Gardnerella vaginalis* aminorūgščių seką, kuri buvo nustatyta anksčiau ir publikuota (GenBank Nr. EU697812, EU 697811). Skirtingi *Gardnerella vaginalis* kamienai gali ekspresuoti vaginolizino variantus, kurių pirminė seka gali skirtis viena ar keliomis aminorūgščių liekanomis nuo sekos SEQ ID: Nr.1.

Anksčiau aprašytieji monokloniniai antikūnai PLY-5, PLY-7, 26-5F12, 26-23C2, 22-6E6 - skiriasi nuo hibridomų 9B4, 3G1 ir 23A2 gaminamų antikūnų tuo, kad jie yra specifiski bakterijų *Streptococcus pneumoniae* toksinui pneumolizinui (PLY) ir neutralizuoja jo citolitinį aktyvumą [EP0687688, WO2006021210].

Anksčiau aprašytieji monokloniniai antikūnai prieš streptoliziną (SLO) skiriasi nuo hibridomų 9B4, 3G1 ir 23A2 gaminamų antikūnų tuo, kad jie yra specifiski SLO ir jo variantams [WO9305152].

Anksčiau aprašytasis monokloninis antikūnas A4-8 - skiriasi nuo hibridomų 9B4, 3G1 ir 23A2 gaminamų antikūnų tuo, kad jis yra specifiskas bakterijų *Listeria monocytogenes* toksinui listeriolizinui (LLO) ir neutralizuoja jo biologinį aktyvumą.

Naujų hibridomų ir jų gaminamų monokloninių antikūnų savybes iliustruoja informacija, pateikta Fig. 1-3.

Fig.1 atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu vaginolizinu ir bakterijų *Gardnerella vaginalis* bei *E.coli* lizatais, naudojant hibridomų 9B4, 23A2 ir 3G1 gaminamus monokloninius antikūnus.

Fig.2 atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu vaginolizinu ir rekombinantiniais citolizinais SLY, LLO ir PLY, naudojant hibridomų 9B4 ir 23A2 gaminamus antikūnus.

Fig.3 iliustruoja hibridomų 9B4 ir 23A2 gaminamų monokloninių antikūnų neutralizuojantį aktyvumą.

10 Naujų monokloninių antikūnų gavimo būdas, jų savybės detaliau aprašomi toliau pateiktuose 1-4 pavyzdžiuose ir 1 lentelėje, kurie iliustruoja, bet neapriboja išradimo esmės.

1 pavyzdys

15 Hibridomų, gaminančių monokloninius antikūnus prieš *Gardnerella vaginalis* vaginoliziną, sukūrimas

BALB/c linijos pelės buvo imunizuojamos išgrynintu rekombinantiniu vaginolizinu, ekspresuotu bakterijose *E.coli*. Pelės buvo imunizuojamos, suleidžiant 50 µg vaginolizino (antigeno) su pilnu Freund'o adjuvantu po oda. Praėjus 4 savaitėms po pirmosios imunizacijos, tuo pat būdu pelės buvo imunizuojamos pakartotinai, suleidžiant 50 µg antigeno su nepilnu Freund'o adjuvantu. Dar po 4 savaičių pelės buvo imunizuojamos, suleidžiant 50 µg antigeno be adjuvanto. Imunizacijų metu buvo tikrinamas antigenui specifiskų antikūnų titras imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Praėjus 3 dienoms po paskutinės imunizacijos, buvo atliekama hibridizacija.

25 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 buvo 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 pasirodė 5-10 dieną po hibridizacijos. Testuojant terpę netiesioginės IFA metodu, buvo tikrinama, ar klonai gamina antikūnus prieš vaginoliziną. Kas 4-5 dienos buvo pakeičiama pusė ląstelių augimo terpės. Pirmą kartą HAT terpė buvo keičiama į hipoksantino-timidino (HT) terpę, turinčią 10^{-4} M hipoksantino ir $1,6 \times 10^{-4}$ M timidino. Vėliau HT terpė buvo palaipsniui keičiama į įprastą augimo terpę. Hibridiniai klonai, gaminantys antikūnus prieš vaginoliziną, buvo klonuojami ribinio praskiedimo metodu. Klonai pasirodė po 4-7 dienų. Jie buvo testuojami netiesioginės IFA metodu. Atrinkti klonai buvo padauginami ir toliau auginami kultūroje arba užšaldomi ir saugomi skystame azote.

Buvo gauta keletas hibridomų klonų, gaminančių monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną. Buvo ištirta jų specifiškumas, neutralizuojantis aktyvumas, nustatyti antikūnų izotipai.

Hibridomos, gaminančios neutralizuojančius monokloninius antikūnus prieš vaginoliziną, buvo pavadintos 9B4, 23A2 ir 3G1 ir deponuotos Biotechnologijos instituto (Vilnius, LT) kolekcijoje. Joms suteikti atitinkami deponavimo numeriai: 9B4 - VLY001, 23A2 - VLY002, 3G1 - VLY003.

2 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų specifiškumo tyrimas ir izotipų nustatymas.

Hibridomų 9B4, 3G1 ir 23A2 gaminamų antikūnų specifiškumas buvo nustatomas imunofermentinės analizės (IFA) bei imunoblotingo metodais. Imunoglobulinų izotipai buvo nustatomi IFA metodu, naudojant izotipų nustatymo rinkinį [Sigma, JAV].

Šiais metodais buvo nustatyta, kad gautieji monokloniniai antikūnai yra IgG izotipo, IgG1 subtipo ir reaguoja su rekombinantiniu vaginolizinu (Fig. 1). Imunoblotingo metodu buvo nustatyta, kad monokloniniai antikūnai reaguoja su 57 kDa dydžio baltymu bakterijų *Gardnerella vaginalis* lizatuose, kuris atitinka vaginoliziną (VLY), tačiau nereaguoja su bakterijų *E.coli* lizato baltymais (Fig. 1). Tai rodo, kad gautieji monokloniniai antikūnai yra specifiški vaginolizinui iš bakterijų *Gardnerella vaginalis*.

1 lentelėje pateikiami duomenys apie hibridomų 9B4, 3G1 ir 23A2 gaminamų antikūnų specifiškumą ir poklasių.

1 lentelė

Hibridomų klonas	Subtipas (poklasė)	Reakcija su skirtingais antigenais:		
		Rekombinantinis VLY	<i>Gardnerella</i> <i>vaginalis</i> lizatas	<i>E.coli</i> lizatas
9B4	IgG1	+	+	-
23A2	IgG1	+	+	-
3G1	IgG1	+	+	-

Fig. 1 atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu VLY ir bakterijų *Gardnerella vaginalis* bei *E.coli* lizatais, naudojant hibridomų 9B4, 23A2 ir 3G1 gaminamus antikūnus. Virš imunoblotingo vaizdo nurodyti antikūnų pavadinimai.

1 takelis - rekombinantinis išgrynintas VLY;

2 takelis – bakterijų *E.coli* lizatas;

3 takelis – bakterijų *Gardnerella vaginalis* lizatas;

M – baltymų molekulinio svorio standartas.

3 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų kryžminio specifiškumo tyrimas

Imunoblotingo metodu buvo ištirtas hibridomų 9B4, 23A2 ir 3G1 gaminamų antikūnų kryžminis specifiškumas, t.y., reakcija su kitais rekombinantiniais citolizinais: SLY, LLO ir

15 PLY. Tyrimui buvo naudojami rekombinantiniai citolizinais, susintetinti *E.coli* bakterijose. Kaip teigiama kontrolė buvo naudojamas rekombinantinis VLY, o kaip neigiama kontrolė - bakterijų *E.coli* lizatai be citolizinių.

Atlikus šį tyrimą, buvo nustatyta, kad gautieji monokloniniai antikūnai reaguoja tik su VLY, bet nereaguoja su kitais rekombinantiniais citolizinais - nei su SLY, nei su LLO, nei su PLY

20 (Fig. 2). Tai rodo, kad gautieji monokloniniai antikūnai yra specifiški tik vaginoliziniui iš bakterijų *Gardnerella vaginalis* ir skiriasi nuo anksčiau aprašytų analogų.

Fig. 2 atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu VLY ir rekombinantiniais citolizinais SLY, LLO ir PLY, naudojant hibridomų 9B4 ir 23A2 gaminamus antikūnus.

25 Virš imunoblotingo vaizdo nurodyti antikūnų pavadinimai. 1 takelyje matoma juostelė atitinka VLY, kuris išryškėja po inkubacijos su antikūnais.

1 takelis - rekombinantinis išgrynintas VLY;

2 takelis – bakterijų *E.coli* lizatas;

- 3 takelis – bakterijų *E.coli* lizatas su SLY;
- 4 takelis – bakterijų *E.coli* lizatas;
- 5 takelis – bakterijų *E.coli* lizatas su LLO;
- 6 takelis – bakterijų *E.coli* lizatas;
- 5 7 takelis – bakterijų *E.coli* lizatas su PLY;
- M – baltymų molekulinio svorio standartas.

4 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų neutralizuojančio aktyvumo tyrimas

- 10 Hibridomų 9B4, 23A2 ir 3G1 gaminamų antikūnų sugebėjimas neutralizuoti VLY citolizinį aktyvumą buvo ištirtas, naudojant žinomą metodą [Walker JA, Allen RL, Falmagne P et al., Infect Immun, 1987, 55, pp. 1184-1189; Cauci S, Monte R, Ropele M et al., Mol Microbiol, 1993, 9, pp. 1143-1155.]. Žmogaus eritrocitų suspensija (1 ml) buvo inkubuojama 15 min 22°C temperatūroje tokiuose inkubacijos mišiniuose:
- 15 1) Fosfatiname buferiniame tirpale (PBS), pH 7,4 (0% hemolizė);
 - 2) Dejonizuotame vandenyje (100% hemolizė);
 - 3) PBS su 5 ng/ml VLY (100% hemolizė);
 - 4) PBS su 5 ng/ml VLY ir 20 ng/ml antikūno 9B4;
 - 5) PBS su 5 ng/ml VLY ir 200 ng/ml antikūno 9B4;
 - 20 6) PBS su 5 ng/ml VLY ir 1000 ng/ml antikūno 9B4;
 - 7) PBS su 5 ng/ml VLY ir 20 ng/ml antikūno 23A2;
 - 8) PBS su 5 ng/ml VLY ir 200 ng/ml antikūno 23A2
 - 9) PBS su 5 ng/ml VLY ir 1000 ng/ml antikūno 23A2,
 - 10) PBS su 5 ng/ml VLY ir 20 ng/ml antikūno 3G1;
 - 25 11) PBS su 5 ng/ml VLY ir 200 ng/ml antikūno 3G1
 - 12) PBS su 5 ng/ml VLY ir 1000 ng/ml antikūno 3G1.

Po inkubacijos eritrocitų suspensija buvo centrifuguojama (3 min, 1000xg) ir matuojamas optinis tankis, esant bangos ilgiui 415 nm. Didelės optinio tankio reikšmės (OT>2.0) rodo, kad įvyko eritrocitų lizė (hemolizė). Mažos optinio tankio reikšmės (OT<0.2) rodo, kad hemolizė nevyko. Esant inkubacijos mišinyje 5 ng/ml rekombinantinio VLY, įvyko eritrocitų lizė (OT = 2,5). Esant inkubacijos mišinyje 20 ng/ml antikūno 9B4 arba 200 ng/ml antikūno 23A2, eritrocitai buvo visiškai apsaugoti nuo VLY sukeltos lizės (Fig.3). Esant

inkubacijos mišinyje 20 ng/ml arba 200 ng/ml antikūno 3G1, eritrocitai nebuvo apsaugoti nuo VLY sukeltos lizės, tačiau jie buvo apsaugoti, esant 1000 ng/ml antikūno 3G1. Tai rodo, kad visi antikūnai blokuoja VLY citolitinį aktyvumą, tačiau 9B4 yra aktyviausias – jis veikia esant 10 kartų mažesnei koncentracijai nei 23A2 ir 50 kartų mažesnei koncentracijai, nei 3G1. Antikūnas 3G1 pasižymi silpnesniu neutralizuojančiu poveikiu, nei 9B4 ir 23A2.

Fig.3 iliustruoja hibridomų 9B4 ir 23A2 gaminamų monokloninių antikūnų neutralizuojantį aktyvumą. Y ašyje atidėtos optinio tankio (OT) reikšmės; X ašyje nurodyti eritrocitų suspensijos mėginių numeriai, kurie atitinka šiuos inkubacijos mišinius:

- 1) Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS),
- 2) Dejonizuotas vanduo;
- 3) PBS su 5 ng/ml VLY;
- 4) PBS su 5 ng/ml VLY ir 20 ng/ml antikūno 9B4;
- 5) PBS su 5 ng/ml VLY ir 200 ng/ml antikūno 9B4;
- 6) PBS su 5 ng/ml VLY ir 1000 ng/ml antikūno 9B4;
- 7) PBS su 5 ng/ml VLY ir 20 ng/ml antikūno 23A2;
- 8) PBS su 5 ng/ml VLY ir 200 ng/ml antikūno 23A2
- 9) PBS su 5 ng/ml VLY ir 1000 ng/ml antikūno 23A2.

Gauti duomenys rodo, kad naujai sukurtieji monokloniniai antikūnai 9B4, 23A2 ir 3G1 yra specifiški vaginolizinui (VLY) iš bakterijų *Gardnerella vaginalis* ir neutralizuoja jo citolitinį aktyvumą. Todėl šie monokloniniai antikūnai galėtų būti taikomi VLY nustatymui imunocheminiais metodais, diagnozuojant *Gardnerella vaginalis* infekciją. Pavyzdžiui, naudojant šiuos antikūnus galėtų būti atliekamas citologinių mėginių ištyrimas imunohistocheminiu, imunoblotingo arba IFA metodu. Nustačius, kad mėginiuose yra VLY, būtų patvirtinama *Gardnerella vaginalis* infekcija.

Naujai sukurtieji antikūnai 9B4 ir 23A2 pasižymi stipriu neutralizuojančiu poveikiu, todėl jie arba jų pagrindu sukurti rekombinantiniai antikūnų analogai gali būti taikomi ir profilaktiniais ar terapiniais tikslais, kovojant su *Gardnerella vaginalis* infekcijos sukelta patologija. Pavyzdžiui, naudojant hibridomų 9B4 ir 23A2 genetinę medžiagą (RNR) galėtų būti konstruojami viengrandžiai antikūnų fragmentai (scFv) arba humanizuoti antikūnai, neutralizuojantys VLY biologinį poveikį. Kadangi VLY yra pagrindinis *Gardnerella vaginalis* virulentiškumo faktorius, jo neutralizacija pašalintų infekcijos pasekmes.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS:

1. Monokloninis antikūnas, atpažįstantis aminorūgščių seką SEQ ID: NO.1

MNNTKFYRNAAMLLLAGATIIPQCLAAPAMAAPAAKDSEPTASC
 5 AAKKDSLNNYLWDLQYDKTNILARHGETIDNKFSSDSFNKGDEFVVVEHQKKNITNTT
 SNLSVTSANDDRVYPGALFRADQNLMDNMPSLISANRAPITLSVDLPGFHGGESAVTV
 QRPTKSSVTSAVNGLVSKWNAQYAASHHVAARMQYDSASAQSMSQLKAKFGADFAKIG
 VPLKIDFDAVHKGEKQTQIVNFKQTYTYSVDAPDSPADFFAPCTTPESLKS RGVDSK
 10 RPPVYVSNVAYGRSMYVKFDTRSKSTDFQAAVEAAIKGVEIKPNTTEFHRILQNTSVTA
 VILGGSANGAAKVITGNVDTLKALIQEGANLSTSSPAVPIAYTTSFVKDNEVATLQTN
 SDYVETKVSSYRDGYLTLDRGAYVARYYYWDEYGTIDGTPYVRSRAWEGNGKYRT
 AHFNTTIQFKGNVHNLRIKLVEKTGLWEPWRTVYDRSDLPLVRQRTIKNWGTTLWPR
 VAETVKND

arba į ją panašią seką, kurios identiškumas yra bent 95%.

15

2. Hibridomos 9B4 ląstelių linija, deponavimo numeris VLY001.

3. Hibridomos 23A2 ląstelių linija, deponavimo numeris VLY002.

20 4. Hibridomos 3G1 ląstelių linija, deponavimo numeris VLY003.

5. Hibridomos ląstelių linija, pasirinkta iš grupės, susidedančios iš 9B4 (deponavimo numeris VLY001), 23A2 (deponavimo numeris VLY002) ir 3G1 (deponavimo numeris VLY003), produkuojanti monokloninius antikūnus pagal 1 punktą prieš vaginoliziną.

25

6. Monokloninis antikūnas, produkuojamas hibridomos ląstelių linijos pagal bet kurį vieną iš 2-5 punktų, kuris yra IgG klasės.

7. Monokloninis antikūnas pagal 6 punktą, kuris yra pelės monokloninis antikūnas.

30

8. Monokloninio antikūno pagal 1 punktą arba 6 punktą panaudojimas, gaminant preparatus, skirtus infekcijos, pavyzdžiui, bakterinės vaginozės, sukeltos *Gardnerella vaginalis*, nustatymui.

35 9. Diagnostinis rinkinys *Gardnerella vaginalis* infekcijai nustatyti, apimantis mažiausiai monokloninį antikūną pagal 1 punktą arba 6 punktą.

LT 5705 B

10. Hibridomos pagal bet kurį iš 2-5 punktų panaudojimas, gaminant preparatus, skirtus neutralizuoti arba blokuoti vaginolizino biologinį aktyvumą.

5 11. Preparatas, gaunamas iš hibridomos pagal bet kurį iš 2-5 punktų, skirtas infekcijos, pavyzdžiui, bakterinės vaginozės, sukeltos *Gardnerella vaginalis*, slopinimui.

10 12. Farmacinė kompozicija, apimanti preparato pagal 11 punktą efektyvų kiekį derinyje su farmaciniu požiūriu priimtiniu nešikliu, skiedikliu, ekscipientu ir/arba pagalbinėmis medžiagomis, skirta *Gardnerella vaginalis* infekcijos sukeltų būklių (patologijų) profilaktikai ir/arba gydymui.

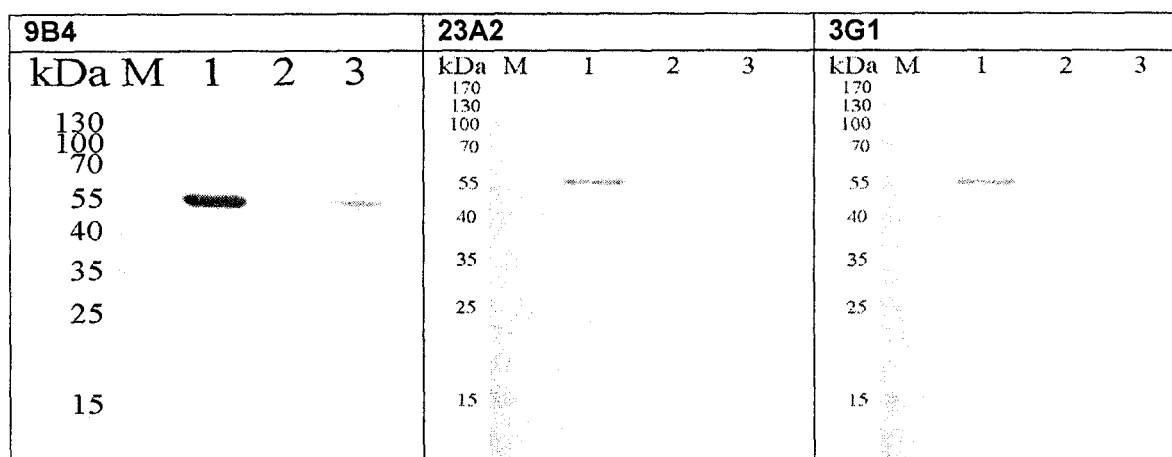


Fig. 1

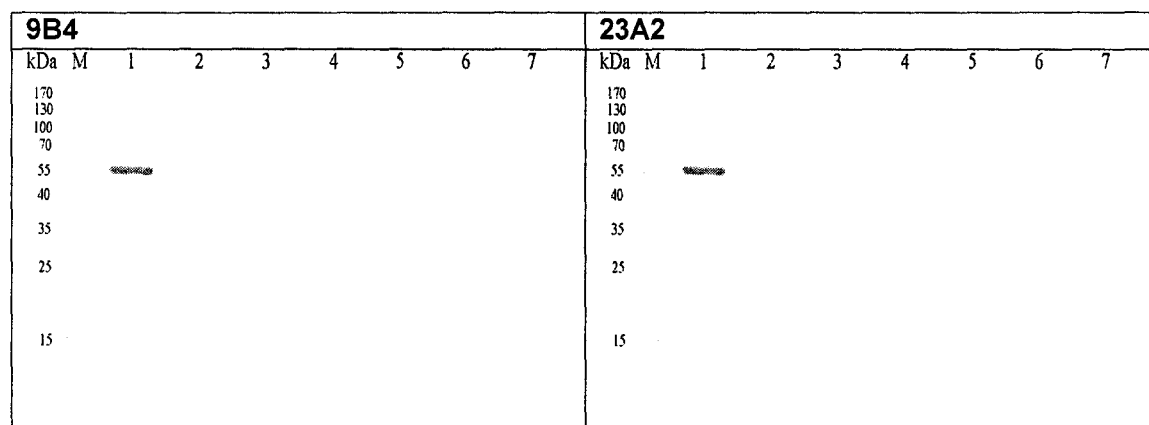


Fig. 2

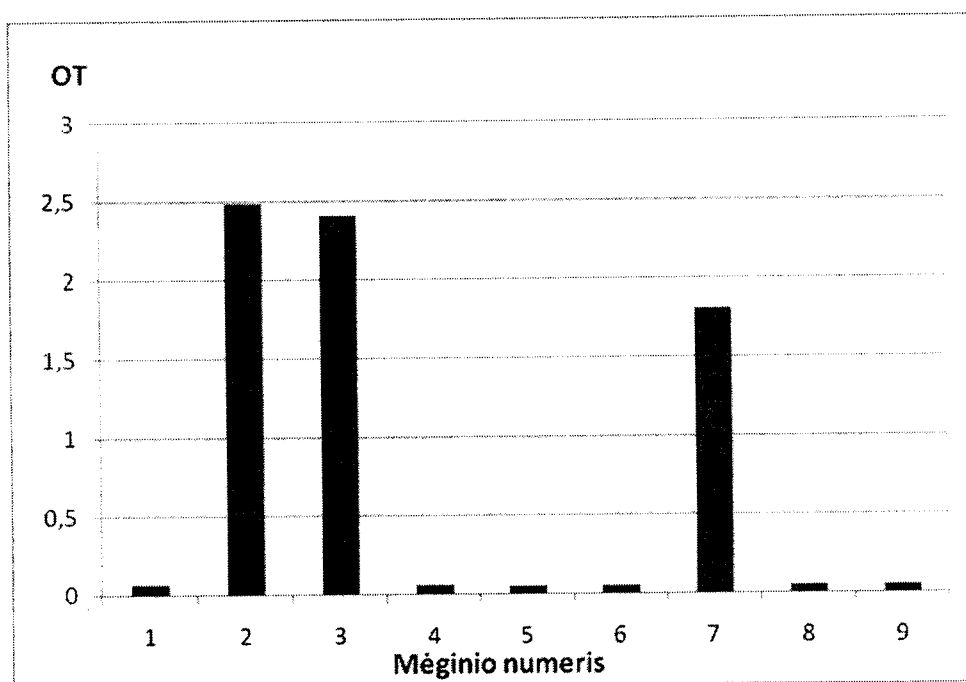


Fig.3