

(19)



(10) **LT 5843 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **5843**

(51) Int. Cl. (2011.01): **C07K 16/00**

(21) Paraiškos numeris: **2010 110**

C12N 15/00

A61K 39/00

(22) Paraiškos padavimo data: **2010 12 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2012 04 25**

(45) Patento paskelbimo data: **2012 06 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 ŽVILBLIENĖ, LT

Rita LASICKIENĖ, LT

Arvydas LAURINAVIČIUS, LT

Romualda SMALIUKIENĖ, LT

Alma GEDVILAITĖ, LT

(73) Patento savininkas:

Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 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 Merkelio poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą VP1

(57) Referatas:

Išradimas apibūdina naujus monokloninius antikūnus, specifiskus Merkelio poliomos viruso pagrindiniam kapsidės baltymui VP1. Sukurtieji monokloniniai antikūnai gali būti taikomi Merkelio poliomos viruso infekcijos arba jos sukeltos Merkelio ląstelių karcinomos diagnostikai. Išradime apibūdintos naujos hibridomos 11A2 ir 9G6, gaminančios monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1. Hibridomos 11A2 gaminami antikūnai atpažįsta Merkelio poliomos virusą infekuotose ląstelėse, tiriant imunohistocheminiu metodu. Hibridomos 9G6 gaminami antikūnai nereaguoja su Merkelio poliomos virusu infekuotose ląstelėse.

Išradimo sritis

Šis išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai. Jo esmė - naujų monokloninių antikūnų prieš Merkelio poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą VP1 sukūrimas. Minėti monokloniniai antikūnai gali rasti pritaikymą medicinoje ir kitose srityse.

Išradimo technikos lygis

Merkelio poliomos virusas, priklausantis *Polyomaviridae* virusų šeimai, buvo identifiкуotas 2008 metais. Manoma, kad šis virusas, integravęsis į ląstelės genomą, gali sukelti retą odos vėžio formą – Merkelio ląstelių karcinomą (MCC), kuri pasitaiko vyresniame amžiuje arba imunosupresijos atveju [Feng H., Shuda M., Chang Y. et al., Science, 208, 319, 1096-1100]. MCC yra agresyvi, greitai progresuojanti liga, kuriai kol kas nėra efektyvaus gydymo, išskyrus chirurginį. Merkelio poliomos viruso nustatymas molekulinės diagnostikos priemonėmis būtų svarbus Merkelio poliomos viruso infekcijos ir MCC diagnozės patvirtinimui, taip pat galėtų turėti didelę prognostinę reikšmę.

MCC nėra paprasta diagnozuoti, nes ši liga pagal klinikinius požymius mažai skiriasi nuo kitų odos piktybinių ir nepiktybinių ligų. Greita ir tiksli diagnozė leistų laiku atlikti chirurginę intervenciją ir išvengti metastazių bei ligos progresavimo.

Šiuo metu nėra klinikinės diagnostikos metodų, kurie leistų tiksliai nustatyti MCC diagnozę. Mokslinėse laboratorijose Merkelio poliomos virusas gali būti nustatomas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu ar kitais metodais, pagrįstais viruso DNR nustatymu [Zampetti A., Feliciani C., Massi G. et al., J. Cutan. Med. Surg., 2010, 14, pp. 51-61]. Šie metodai gana sudėtingi, reikalauja specialios įrangos ir patirties molekulinės biotechnologijos srityje, sunkiai įdiejami klinikos sąlygomis.

Todėl vyksta alternatyvių, paprastesnių MCC diagnostikos metodų ir priemonių, kuriuos būtų lengva naudoti klinikinės diagnostikos laboratorijose, paieška. Tokių,

kaip, pavyzdžiui, gripo viruso nustatymas tiesioginės imunofluorescencijos metodu nosiaryklės citologiniuose mėginiuose, kuris yra laikomas „auksiniu standartu“ šios infekcijos diagnostikai [Gharabaghi F., Tellier R., Cheung R. et al., J.Clin Virol., 2008, 42, 190-193].

- 5 Norint taikyti imunocheminius metodus virusų nustatymui, reikalingi antikūnai, kurie gali būti sukurti prieš natyvų virusą arba prieš atskirus viruso komponentus. Buvo aprašyti antikūnai prieš kitus poliomos virusus. Pavyzdžiui, beždžionės poliomos viruso SV40 nustatymui limfomos audinyje imunohistocheminiu metodu naudojami antikūnai, specifiški SV40 T antigenui [Toracchio S., Kozinetz C.A., Killen D.E et al., J.Clin. Virol., 46, 154-160]. Dažnai antikūnų kūrimui naudojami rekombinantiniai antigenai, susintetinti bakterijų, mielių ar žinduolių ląstelėse. Buvo aprašyti rekombinantiniai Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymai (VP1, VP2, VP3), tačiau jų panaudojimas antikūnų kūrimui nebuvo aprašytas [WO 2009/079481]. Buvo sukurti monokloniniai antikūnai prieš rekombinantinį žiurkėno poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą
- 15 VP1, kurie gali būti naudojami šio viruso nustatymui infekuotose ląstelėse [Zvirbliene A., Samonskyte L., Gedvilaite A. et al., J. Immunol. Meth., 2006; 311, 57-70]. Naudojant bakulovirusuose susintetintus rekombinantinius antigenus, buvo sukurti monokloniniai antikūnai prieš žmogaus poliomos virusų BKV ir JCV bei beždžionės poliomos viruso SV40 kapsidės baltymus. Nustatyta, kad kai kurie šių antikūnų
- 20 atpažįsta konformacinius epitopus, pasižymi kryžminiu specifiškumu ir kartais turi virusus neutralizuojantį aktyvumą [Randhawa P., Viscidi R., Carter JJ et al., J Gen Virol. 2009 90, 634-639].

- 25 Monokloniniai antikūnai prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1 nėra aprašyti.

Šio išradimo uždavinys buvo sukurti tokius monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą VP1, kurie būtų tinkami tiksliam ir paprastam šio viruso nustatymui audinio mėginyje.

- 30 Išradimo esmė

Pagrindiniai išradimo objektai yra hibridoma 11A2 (MPV001 arba DSM ACC3097) ir hibridoma 9G6 (MPV002), produkuojančios monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1, o taip pat šių hibridomų produkuojami monokloniniai antikūnai, atpažįstantys aminorūgščių seką (SEQ NO:1)

MAPKRKASSTCKTPKRQCIPKPGCCPNVASVPKLLVKGGVEVLSVVTGEDSITQ
 IELYNPRMGVNSPDLPTTSNWYTYTYDLQPKGSSPDQPIKENLPAYSVARVSL
 PMLNEDITCDTLQMWEAISVKTEVVGISLINVHYWDMKRVHDYGAGIPVSGV
 NYHMFAIGGEPLDLQGLVLDYQTQYPKTTNGGPITETVLGRKMTPKNQGLDP
 5 QAKAKLDKDGNYPIEVWCPDPSKNENSRYYGSIQTGSQTPTVLQFSNTLTTVLL
 DENGVGPLCKGDGLFISCADIVGFLFKTSGKMALHGLPRYFNVTLRKRWVKNP
 YPVVNLINSLFSNLMPKVSGQPMEGKDNQVEEVRIYEGSEQLPGDPDIVRFLDK
 FGQEKTVYPKPSVAPAAVTFQSNQQDKGKAPLKGPQKASQKESQTQEL

arba panašią seką, kurios identiškumas yra bent 95%.

- 10 Išradimo monokloniniai antikūnai gali būti naudojami Merkelio poliomos viruso VP1 baltymo nustatymui audinio mėginyje, o hibridomos 11A2 (MPV001 arba DSM ACC3097) gaminami monokloniniai antikūnai – taip pat ir Merkelio ląstelių karcinomos (MCC) nustatymui audinio mėginyje, tiriant histologinį mėginį imunohistocheminiu, imunoblotingo arba IFA metodu.
- 15 Kiti išradimo objektai - diagnostinė kompozicija Merkelio poliomos viruso nustatymui audinio mėginyje, apimanti išradimo monokloninių antikūnų efektyvų kiekį, bei diagnostinė kompozicija Merkelio ląstelių karcinomos (MCC) nustatymui audinio mėginyje, apimanti hibridomos 11A2 (MPV001 arba DSM ACC3097) gaminamų monokloninių antikūnų efektyvų kiekį.
- 20 Šiame išradime siūlomi monokloniniai antikūnai yra nauji ir skiriasi nuo analogų iš kitų šaltinių.

Trumpas brėžinių aprašymas

- Fig.1 atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1, žmogaus poliomos viruso JCV kapsidės baltymu VP1 bei mielių *S.cerevisiae* lizatu, naudojant hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminamus monokloninius antikūnus (žiūr. 2 pavyzdį).

- Fig.2 iliustruoja hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminamų monokloninių antikūnų sugebėjimą atpažinti Merkelio poliomos virusą ląstelėse, kurios yra infekuotos šiuo virusu (žiūr. 3 pavyzdį).

Detalus išradimo aprašymas

Išradimo autoriams pavyko sukurti 2 hibridomų linijas, kurių produkuojamų monokloninių antikūnų specifiškumas pasirodė tinkamas Merkelio poliomos viruso VP1 baltymo identifikavimui skirtingais imunocheminiais metodais.

Atlikti tyrimai parodė, kad sukurtieji monokloniniai antikūnai reaguoja tiek su
5 rekombinantiniu išgrynintu Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1, susintetintu mielėse *S.cerevisiae*, tiek su natyviu Merkelio poliomos virusu infekuotame audinyje. Taigi, šie antikūnai pasirodė tinkami Merkelio poliomos viruso infekcijos arba MCC diagnostikai.

10 Siekiant sukurti naujus monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1, buvo panaudotas rekombinantinis mielėse *S.cerevisiae* susintetintas Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymas VP1 ir atliktos šios procedūros, būtent:

1) atliekama imunizacija: išgrynintas Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymas VP1
15 (antigenas) buvo suleidžiamas BALB/c linijos pelėms po oda. Prieš injekciją antigeno tirpalas buvo lygiu tūriu sumaišomas su pilnu Freund'o adjuvantu;

2) atliekama pakartotinė imunizacija – po tam tikro laiko pelėms dar kartą buvo suleidžiama tokia pat antigeno dozė po oda, prieš tai antigeno tirpalą sumaišius su nepilnu Freund'o adjuvantu;

20 3) dar po kelių 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 kelioms dienoms po trečiosios imunizacijos, buvo atliekama pelių blužnies
25 ląstelių hibridizacija, suliejant jas su vėžinėmis ląstelėmis. Ši ir kitos procedūros buvo atliekamos pagal anksčiau aprašytą metodiką, 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 Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą
30 VP1. Tam buvo naudojamas IFA metodas;

6) gautos hibridomos buvo charakterizuojamos pagal įvairius požymius:

- nustatant jų gaminamų monokloninių antikūnų izotipą;

- ištiriant antikūnų specifiškumą IFA, imunoblotingo ir imunohistocheminiu metodais.

- 7) identifikavus hibridomas, kurios gamina monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą VP1, jos buvo klonuojamos, padauginamos ir užšaldomos tolesniam saugojimui;
- 8) hibridomų gaminami monokloniniai antikūnai buvo charakterizuojami žinomais būdais:
- IFA bei imunoblotingu, naudojant kaip antigeną rekombinantinį Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1,
 - imunohistocheminiu metodu, naudojant audinių mėginius iš Merkelio ląstelių karcinomos.
- 10 Taigi, atlikus pelių BALB/c imunizacijas rekombinantiniu Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1 ir suliejus imunizuotų pelių blužnies ląsteles su mielomos ląstelėmis, buvo gautos hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1. Ištyrus gautų monokloninių antikūnų savybes, buvo nustatyta, kad jie reaguoja su natyviu Merkelio poliomos virusu mėginyje, paimtame iš Merkelio ląstelių karcinomos audinio, ir nereaguoja su normalaus audinio mėginiu, kuriame nėra minėto viruso.
- Aprašytu būdu buvo gautos ir ištirtos 2 naujos hibridomos, tačiau tik viena jų pasirodė tinkama atpažinti Merkelio poliomos virusą MCC histologiniame mėginyje. Šios hibridomos deponuotos Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje:
- 20 1) Hibridoma 11A2, deponavimo numeris MPV001, kuri gamina IgG2a poklasio (subtipo) monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą VP1;
- 2) Hibridoma 9G6, deponavimo numeris MPV002, kuri gamina IgG1 poklasio (subtipo) monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą VP1.
- 25 Hibridoma 11A2 taip pat deponuota Vokietijos ląstelių kultūrų kolekcijoje (DSMZ). Jai suteiktas deponavimo numeris: DSM ACC3097.
- 30 Hibridomas 11A2 ir 9G6 apibūdina šie požymiai.
- Morfologiniai požymiai. Hibridomos yra sferinės formos, lygiais kraštais, turi stambų branduolį. Dauginasi suspensijoje, pasižymi silpna adhezija ant stiklo arba plastiko paviršiaus.

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

Laštelių kultūros požymiai. Hibridomų kultivavimo sąlygos: augimo terpė - Dulbecco 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. Lastelės 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: 1x10⁶ – 2x10⁶ laštelių mililitre, temperatūros režimas – 1°C per minutę iki -70°C. Po paros ampulės su laštelėmis perkeliama į skystą azotą. Kultūrų atgaivinimui ampulės atšildomos 37°C temperatūros vandens vonioje. Laštelių 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 (laštelių kultūros persėjimų).

20 Produktų charakteristika. Hibridomos 11A2 ir 9G6 gamina monokloninius antikūnus, specifiskus Merkelio poliomos viruso pagrindiniam kapsidės baltymui VP1. Hibridomos 11A2 gaminami monokloniniai antikūnai yra IgG klasės, IgG2a poklasio. Jie atpažįsta rekombinantinį Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1 ir Merkelio poliomos virusą infekuotame audinyje. Hibridomos 9G6 gaminami
25 monokloniniai antikūnai yra IgG klasės, IgG1 poklasio. Jie atpažįsta rekombinantinį Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1.

Hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminami monokloniniai antikūnai skiriasi nuo aprašytų analogų – monokloninių antikūnų prieš kitų poliomos virusų baltymus - pagal tą
30 požymį, kad jie yra specifiški Merkelio poliomos viruso pagrindiniam kapsidės baltymui VP1, kuris funkciškai ir struktūriškai skiriasi nuo kitų poliomos virusų baltymų. Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymas VP1 skiriasi nuo kitų poliomos virusų baltymų pagal baltymo pirminę struktūrą (aminorūgščių seką).

Hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminami monokloniniai antikūnai atpažįsta šią aminorūgščių seką (SEQ NO:1):

MAPKRKASSTCKTPKRQCIPKPGCCPNVASVPKLLVKGGEVLSVVTGEDSITQ
 IELYLNPRMGVNSPDLPTTSNWYTYTYDLQPKGSSPDQPIKENLPAYSVARVSL
 5 PMLNEDITCDTLQMWEAISVKTEVVGISLINVHYWDMKRVHDYAGAGIPVSGV
 NYHMFAGGEPLDLQGLVLDYQTQYPKTTNGGPITETVLGRKMTPKNQGLDP
 QAKAKLDKDGNYPIEVWCPDPSKNENSRYYGSIQTGSQTPTVLQFSNTLTTVLL
 DENGVGPLCKGDGLFISCADIVGFLFKTSGKMALHGLPRYFNVTLRKRWVKNP
 YPVVNLINSLFSNLMPKVSQPMEGKDNQVEEVRIYEGSEQLPGDPDIVRFLDK
 10 FGQEKTVYPKPSVAPAAVTFQSNQQDKGKAPLKGPQKASQKESQTQEL

Anksčiau aprašytieji analogai – monokloniniai antikūnai prieš žiurkėno poliomos viruso pagrindinį kapsidės baltymą VP1 - skiriasi nuo hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminamų antikūnų, nes jie yra specifiški žiurkėno poliomos viruso pagrindiniam kapsidės baltymui VP1, kuris pagal aminorūgščių seką skiriasi nuo Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymo VP1 [Zvirbliene A., Samonskyte L., Gedvilaite A. et al., J. Immunol. Meth., 2006; 311, 57-70].

Anksčiau aprašytieji analogai – monokloniniai antikūnai prieš žmogaus poliomos virusų BKV ir JCV bei beždžionės poliomos viruso SV40 kapsidės baltymus - skiriasi nuo hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminamų antikūnų, nes jie yra specifiški kitų poliomos virusų kapsidės baltymams VP1, kurie pagal aminorūgščių seką skiriasi nuo Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymo VP1 [Randhawa P, Viscidi R, Carter JJ et al., J Gen Virol. 2009 90, 634-639].

25 Naujų monokloninių antikūnų gavimo būdas, jų savybės detalčiau aprašomi toliau pateiktuose 1-3 pavyzdžiuose ir 1 lentelėje, kurie iliustruoja, bet neapriboja išradimo apimties.

1 pavyzdys

30 **Hibridomų, gaminančių monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1, sukūrimas**

BALB/c linijos pelės buvo imunizuojamos išgrynintu rekombinantiniu Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1, ekspresuotu mielėse *S.cerevisiae*. Pelės buvo imunizuojamos, suleidžiant 50 µg antigeno su pilnu Freund'o adjuvantu po oda. Praėjus

4 savaitėms po pirmosios imunizacijos, tuo pat būdu pelės buvo imunizuojamos pakartotinai, suleidžiant 50 μ g antigeno su nepilnu Freund'o adjuvantu. Dar po 4 savaitių pelės buvo imunizuojamos, suleidžiant 50 μ g antigeno be adjuvanto. Imunizacijų metu buvo tikrinamas antigenui specifiskų antikūnų titras imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Praėjus 3 dienoms po paskutinės imunizacijos, buvo 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 buvo atliekama, 2 minutes veikiant ląsteles 50% polietilenglikolio (PEG-4000, Sigma, JAV) tirpalu Dulbecco 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 Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1. 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 Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1, 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 Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1. Buvo iširta jų specifiskumas, nustatyti antikūnų izotipai.

Hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1, buvo pavadintos 11A2 ir 9G6. Jos deponuotos, kaip nurodyta aukščiau, Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės

biologijos laboratorijoje (11A2 - deponavimo numeris MPV001, 9G6 - deponavimo numeris MPV001) ir Vokietijos ląstelių kultūrų kolekcijoje (DSMZ) (11A2-deponavimo numeris DSM ACC3097).

5 2 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų specifiškumo tyrimas ir izotipų nustatymas.

Hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminamų antikūnų specifiškumas buvo nustatomas imunofermentinės analizės (IFA) bei imunoblotingo metodais. Imunoglobulinų izotipai buvo nustatomi IFA metodu, naudojant izotipų nustatymo rinkinį [Sigma, JAV] .

- 10 Šiais metodais buvo nustatyta, kad antikūnas 11A2 yra IgG izotipo, IgG2a subtipo, antikūnas 9G6 yra IgG1 subtipo. Abu antikūnai reaguoja su rekombinantiniu Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1 (Fig. 1 B, C). Imunoblotingo metodu buvo nustatyta, kad monokloniniai antikūnai 11A2 ir 9G6 reaguoja su 60 kDa dydžio baltymu mielių *S.cerevisiae* lizatuose, kuris atitinka Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą
- 15 VP1, tačiau nereaguoja su mielių *S.cerevisiae* lizato baltymais (Fig. 1, B, C, takeliai 3 ir 4). Antikūnai 11A2 ir 9G6 taip pat reaguoja su išgrynintu Merkelio poliomos viruso (MPV) kapsidės baltymu VP1, tačiau nereaguoja su žmogaus poliomos viruso JCV kapsidės baltymu VP1 (Fig. 1, B, C, takeliai 1 ir 2). Tai rodo, kad gautieji monokloniniai antikūnai yra specifiški Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymui
- 20 VP1.

1 lentelėje pateikiami duomenys apie hibridomų gaminamų antikūnų 11A2 ir 9G6 specifiškumą ir poklasių.

1 lentelė

Hibridomų klonas	Izotipas	Reakcija su skirtingais antigenais:		
		MPV VP1	JCV VP1	<i>S.cerevisiae</i> lizatas
11A2	IgG2a	+	-	-
9G6	IgG1	+	-	-

25

Fig. 1 atkartoja baltymų elektroforezės vaizdą (A) ir imunoblotingo vaizdą (B, C), gautą su rekombinantiniu Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1, žmogaus poliomos viruso JCV kapsidės baltymu VP1 bei mielių *S.cerevisiae* lizatu, naudojant

hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminamus monokloninius antikūnus. Imunoblotingo vaizdas gautas su skirtingais antikūnais: B – 11A2, C – 9G6.

1 takelis – išgrynintas rekombinantinis Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1;

5 2 takelis – išgrynintas žmogaus poliomos viruso JCV kapsidės baltymas VP1;

3 takelis – mielių *S.cerevisiae* lizatas su Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1;

4 takelis – mielių *S.cerevisiae* lizatas be Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymo VP1.

10 M – baltymų molekulinio svorio standartas.

1 ir 3 takeliuose matoma juostelė, išryškėjusi po inkubacijos su antikūnais, atitinka 60 kDa dydžio baltymą, kuris yra Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymas VP1.

3 pavyzdys.

15 Monokloninių antikūnų specifiškumo tyrimas imunohistocheminiu metodu

Imunohistocheminiu metodu buvo ištirta, ar hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminami antikūnai atpažįsta Merkelio poliomos virusą. Tyrimui buvo naudojami odos mėginiai, paimti iš vėžinio audinio - Merkelio ląstelių karcinomos. Šis audinys buvo ištirtas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu ir nustatyta, kad jame yra ląstelių, infekuotų Merkelio poliomos virusu. Kaip neigiama kontrolė buvo naudojami mėginiai, paimti iš normalaus (nevėžinio) audinio (sveikos odos). PGR metodu buvo patvirtinta, kad šiame audinyje nėra ląstelių, infekuotų Merkelio poliomos virusu. Audinių mėginiai buvo inkubuojami su antikūnais 11A2 ir 9G6 ir tiriama, ar jie specifiškai atpažįsta Merkelio poliomos virusą audinyje, kuriame yra šiuo virusu infekuotų ląstelių.

25 Atlikus imunohistocheminį tyrimą, buvo nustatyta, kad antikūnas 11A2 reaguoja su ląstelėmis, esančiomis Merkelio ląstelių karcinomos audinyje, bet nereaguoja su normalaus (sveiko) audinio ląstelėmis (Fig. 2). Tai rodo, kad antikūnas 11A2 atpažįsta Merkelio poliomos virusą infekuotose ląstelėse. Taigi, šis antikūnas skiriasi nuo anksčiau aprašytų analogų, kurie yra specifiški kitiems poliomos virusams, ir tinka

30 Merkelio poliomos viruso nustatymui odos mėginyje imunohistocheminiu metodu. Buvo nustatyta, kad antikūnas 9G6 nereaguoja su ląstelėmis, esančiomis Merkelio ląstelių karcinomos audinyje (Fig. 2). Todėl šis antikūnas netinka Merkelio poliomos viruso nustatymui imunohistocheminiu metodu.

Fig. 2 atkartoja imunohistocheminio tyrimo vaizdą, gautą su Merkelio ląstelių karcinomos audiniu ir normaliu (sveikos odos) audiniu, naudojant hibridomų 11A2 ir 9G6 gaminamus antikūnus. Imunohistocheminio tyrimo vaizdai atitinka tokius atvejus:

- 2.1 B08-18233 MCC biopsijos mėginys inkubuotas su 11A2;
- 5 2.2 B08-18233 MCC biopsijos mėginys inkubuotas su 9G6;
- 2.3 Ne MCC audinio mėginys inkubuotas su 11A2;
- 2.4 Ne MCC audinio mėginys inkubuotas su 9G6.

Gauti duomenys rodo, kad naujai sukurtieji monokloniniai antikūnai 11A2 ir 9G6 yra
10 specifiški Merkelio poliomos viruso pagrindiniam kapsidės baltymui VP1. Šie antikūnai skiriasi nuo anksčiau aprašytų analogų, kurie yra specifiški kitų poliomos virusų baltymams. Antikūnai 11A2 ir 9G6 specifiskai reaguoja su rekombinantiniu Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymu VP1 ir nereaguoja su žmogaus poliomos viruso JCV kapsidės baltymu VP1. Vienas iš naujai sukurtų antikūnų – klonas 11A2 - atpažįsta
15 Merkelio poliomos virusą infekuotose ląstelėse, tiriant imunohistocheminiu metodu. Sukurtieji monokloniniai antikūnai galėtų būti taikomi Merkelio poliomos viruso nustatymui imunocheminiais metodais, diagnozuojant šio viruso infekciją arba jo sukeltą Merkelio ląstelių karcinomą. Pavyzdžiui, naudojant šiuos antikūnus galėtų būti atliekamas histologinių mėginių ištyrimas imunohistocheminiu, imunoblotingo arba
20 IFA metodu. Nustačius, kad mėginiuose yra Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymo VP1, būtų patvirtinama Merkelio poliomos viruso infekcija arba Merkelio ląstelių karcinoma.

Diagnostinė kompozicija Merkelio poliomos viruso nustatymui audinio mėginyje, be
25 išradimo monokloninių antikūnų efektyvaus kiekio, gali turėti kitų tinkamų papildomų medžiagų. Optimaliame išradimo įgyvendinimo variante diagnostinė kompozicija taip pat turėjo natrio fosfato (0,01 M), natrio chlorido (0,15 M) ir jaučio serumo albumino (1 mg/ml), tirpalo pH esant 7,2.

30 Diagnostinė kompozicija Merkelio ląstelių karcinomos (MCC) nustatymui audinio mėginyje, be hibridomos 11A2 (MPV001 arba DSM ACC3097) gaminamų monokloninių antikūnų efektyvaus kiekio gali turėti kitų tinkamų papildomų medžiagų. Optimaliame išradimo įgyvendinimo variante diagnostinė kompozicija Merkelio ląstelių karcinomos (MCC) nustatymui turėjo 0,01 mg/ml hibridomos 11A2 (MPV001 arba

DSM ACC3097) gaminamų monokloninių antikūnų, o taip pat natrio fosfato (0,01 M), natrio chlorido (0,15 M) ir jaučio serumo albumino (1 mg/ml).

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS:

1. Hibridoma 11A2 (MPV001 arba DSM ACC3097), produkuojanti monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1.
2. Hibridoma 9G6 (MPV002), produkuojanti monokloninius antikūnus prieš Merkelio poliomos viruso kapsidės baltymą VP1.
3. Monokloniniai antikūnai, atpažįstantys aminorūgščių seką (SEQ NO:1)
MAPKRKASSTCKTPKRQCIPKPGCCPNVASVPKLLVKGGVEVLSVVTGEDSITQ
IELYLNPRMGVNSPDLPTTSNWYTYTYDLQPKGSSPDQPIKENLPAYSVARVSL
PMLNEDITCDTLQMWEAISVKTEVVGISLINVHYWDMKRVHDYGAGIPVSGV
NYHMF AIGGEPLDLQGLVLDYQTQYPKTTNGGPIT IETVLGRKMTPKNQGLDP
QAKAKLDKDGNYPIEVWCPDPSKNENSRYYGSIQTGSQTPTVLQFSNTLT TVLL
DENG VGPLCKGDGLFISCADIVGFLFKTSGK MALHGLPRYFNVTLRKRWVKNP
YPVVNLINSLFSNLMPKVSGQPMEGKDNQVEEVRIYEGSEQLPGDPDIVRFLDK
FGQEKTVYPKPSVAPAAVTFQSNQQDKGKAPLKGPQKASQKESQTQEL
arba panašią seką, kurios identiškumas yra bent 95%.
4. Monokloniniai antikūnai pagal 3 punktą, produkuojami hibridomos 11A2 (MPV001 arba DSM ACC 3097) pagal 1 punktą.
5. Monokloniniai antikūnai pagal 3 punktą, produkuojami hibridomos 9G6 (MPV002) pagal 2 punktą.
6. Monokloniniai antikūnai pagal bet kurį iš 3-5 punktų, skirti naudoti Merkelio poliomos viruso nustatymui.
7. Monokloniniai antikūnai pagal 4 punktą, skirti naudoti Merkelio ląstelių karcinomos (MCC) nustatymui.
8. Monokloninių antikūnų pagal 6 arba 7 punktą panaudojimas tiriant histologinį mėginį imunohistocheminiu, imunoblotingo arba IFA metodu.
9. Diagnostinė kompozicija Merkelio poliomos viruso nustatymui audinio mėginyje, apimanti monokloninių antikūnų pagal bet kurį iš 3-5 punktų efektyvų kiekį.
10. Diagnostinė kompozicija Merkelio ląstelių karcinomos (MCC) nustatymui audinio mėginyje, apimanti monokloninių antikūnų pagal 4 punktą efektyvų kiekį.

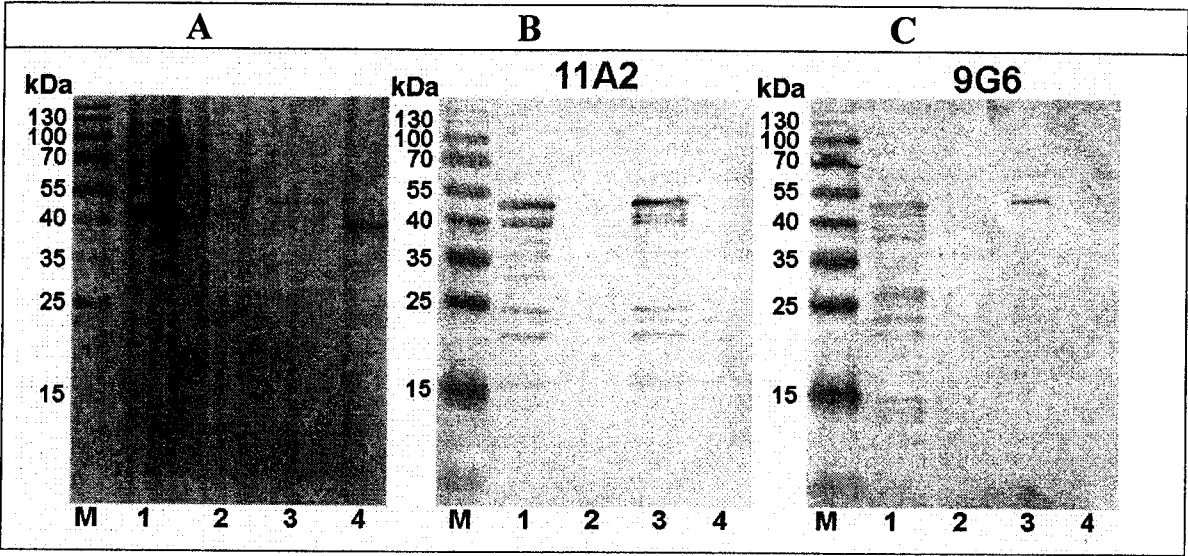


Fig.1

5

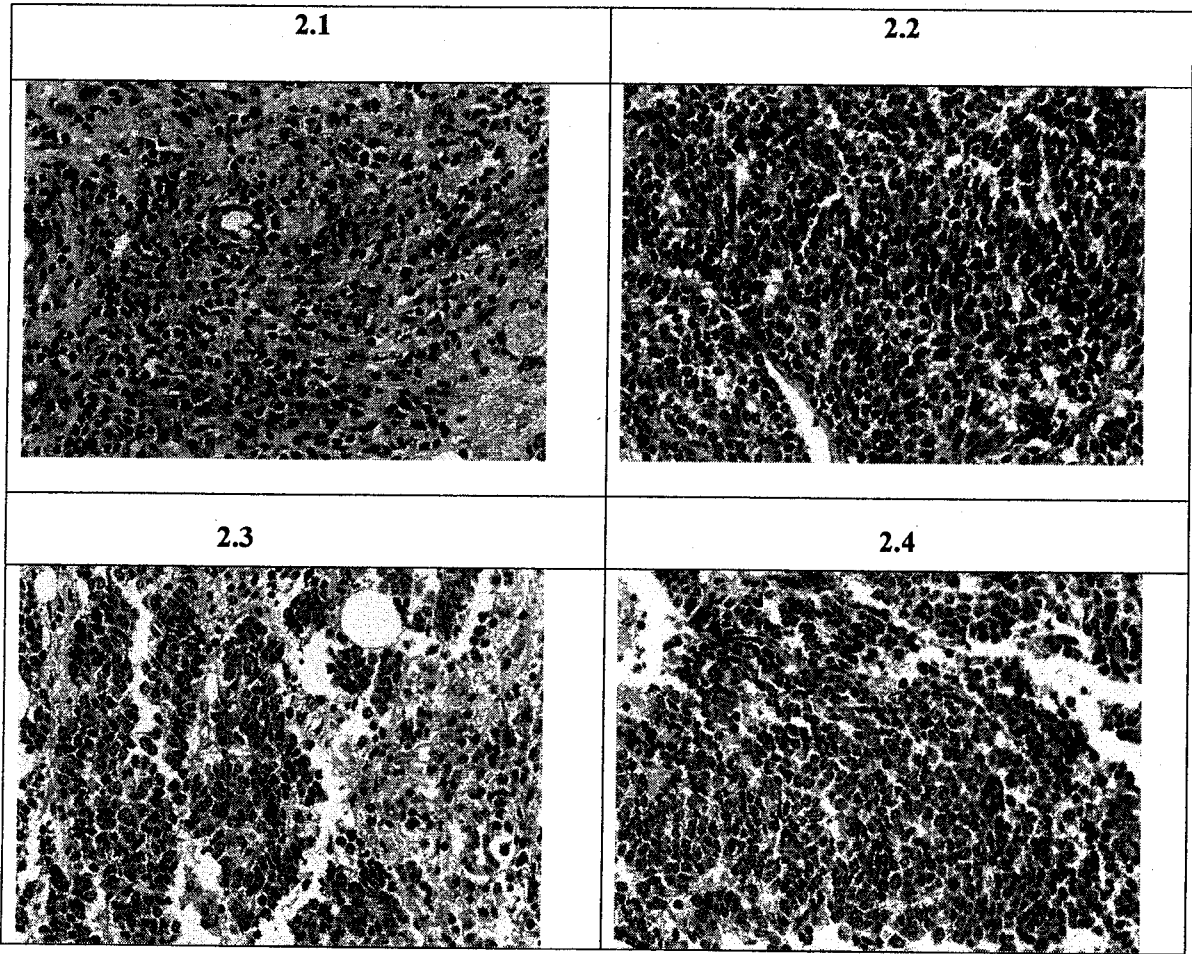


Fig.2