

(19)



(10) **LT 5855 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **5855** (51) Int. Cl. (2011.01): **C07K 16/00**
C12N 5/00
A61K 39/00
- (21) Paraiškos numeris: **2010 104**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2010 12 07**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2012 06 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **2012 08 27**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Milda PLEČKAITYTĖ, LT
Edita MIŠTINIENĖ, LT
Jonas Henrikas PESLIAKAS, LT
Gintautas ŽVIRBLIS, LT
Aurelija ŽVIRBLIENĖ, 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:
Rekombinantinis viengrandžio antikūno fragmentas, neutralizuojantis
vaginolizino citolitinį aktyvumą
- (57) Referatas:

Genų inžinerijos būdu iš hibridomos 9B4 (DSM ACC2991) gautas rekombinantinis antikūno fragmentas scFv. Jis buvo sėkmingai išgrynintas ir parodytas jo specifiskumas VLY citolizinui iš *G.vaginalis* bakterijų ir efektyvi citolitinio aktyvumo neutralizacija. Išradimo pavyzdžiai parodo, kad rekombinantinis antikūno fragmentas scFv gali būti naudojamas terapiniais ir profilaktiniais tikslais gydant patologijas, sukeltas *G.vaginalis* infekcijos, arba išvengiant jų. Gauti viengrandžiai antikūno fragmentai (scFv) atskleidė svarbius privalumus prieš tradiciniu keliu gautus monokloninius antikūnus: pagaminti scFv galima paprastesniu ir pigesniu bakterinės biosintezės būdu, dėl mažesnės molekulinės masės tokie baltymai lengviau prasiskverbia į infekcijos pažeistus audinius.

Išradimo sritis

- 5 Išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai; jis aprašo rekombinantinio viengrandžio antikūno fragmento (scFv), neutralizuojančio vaginolizino citolitinį aktyvumą, gavimą.

Išradimo technikos lygis

- 10 Vaginolizinas (VLY) yra pagrindinis *Gardnerella vaginalis* bakterijų virulentiškumo faktorius. Jis priskiriamas didelei poras formuojančių, nuo cholesterolio priklausomų toksinų citolizinių (CDCs), šeimai. Šios šeimos toksinai randami daugiau negu 20-yje bakterijų rūšių, įskaitant *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Arcanobacterium*, *Bacillus* ir kitas. Šie toksinai (dažnai vadinami citolizinais ar
- 15 hemolizinais) sukelia ląstelės membranos lizę ir atlieka keletą kitų funkcijų, įskaitant citokinų indukciją ir imuninės sistemos moduliaciją. Taigi, labai tikėtina, kad šie citolizinais veikia kaip virulentiškumo faktoriai aukščiau minėtų bakterijų infekciniuose procesuose. [Tweten R. K. Infect. Immun. 2005, 73, pp.6199-6209].

- Bakterijos *G.vaginalis* yra žinomos kaip bakterinės vaginozės (BV) sukėlėjai ir
- 20 tikėtina, kad jų sekretuojamas VLY toksinas ir yra atsakingas už minėtos ligos progresavimą. [Cauci S, Monte M, Ropele C et al., Mol Microbiol, 1993, 9, pp. 53-58]. BV įtakoja milijonų moterų sveikatą, nes manoma, jog yra priešlaikinis gimdymo lemiančio mažą naujagimių svorį ir naujagimių mirtingumą ir sergamumą, sukėlėjas. Be to, nustatyta, jog BV yra pooperacinio endometrito ir
- 25 dubens uždegimo priežastis. Galima manyti, kad VLY neutralizavimas naudojant antikūnus galėtų būti perspektyvus *G.vaginalis* sukeltų patogeninių efektų gydymo ir profilaktikos metodas.

- Antikūnai, neutralizuojantys bakterinius toksinus, buvo aprašyti 1993 metais, kai
- 30 buvo gauti nauji monokloniniai antikūnai prieš stabligės toksiną ir išanalizuotas jų apsauginis efektas. [Lang et al., J. Immunol. 1993, 151, pp. 466-472].

Monokloniniai antikūnai prieš botulizmo toksiną buvo gauti naudojant fagų ekspozicijos bibliotekas, gautas iš imunizuotų pelių ir žmogaus [Brekke and Sandlie, Nat.Rev. Drug Discov. 2002, 2, pp. 52-62]. Neseniai buvo gauti pelių monokloniniai antikūnai prieš pneumoliziną ir jų efektyvumas patikrintas ant gyvūnų modelių. [Garsia-Suarez et al., Infect. Immun. 2004, 72, pp. 4534-4540]. Buvo identifikuotas pelių monokloninis antikūnas PLY5, kuris neutralizavo įvairius citolizinus. Parodyta, kad šis monokloninis antikūnas susiriša su specifiniu epitopu – undekapeptidu, bendru visai cholesterolį surišančiai toksinų grupei. Šis monokloninis antikūnas inhibuoja toksinų prisirišimą prie ląstelės membranos, kadangi yra uždengiamas undekapeptido epitopas [Jacobs et al., FEBS Lett. 1999, 459, pp. 463-466].

Genų inžinerijos ir antikūnų humanizacijos technikos tobulėjimas leidžia antikūnus plačiai naudoti biofarmaciniuose preparatuose. Šiuolaikinė rekombinantinės DNR technologija leidžia sukonstruoti ir ekspresuoti modifikuotus (pakeistus) antikūnus. Šios naujos molekulės yra suprojektuotos naujai specifinei paskirčiai. Biofarmacinės paskirties antikūnai gali būti gauti skirtingų formų – pilno ilgio chimerinės formos, kitaip vadinami humanizuoti imunoglobulinai, arba antikūnų fragmentai, apimantys tik antigeną surišantį antikūno regioną (scFv). Genai, koduojantys variabilius (kintamus) imunoglobulinų fragmentus, gali būti klonuojami iš pelės arba žmogaus B limfocitų ir ekspresuoti bakterijose, mielėse, augalų ir žinduolių ląstelėse arba fagų ekspozicijos sistemose. Visa eilė chimerinių antikūnų yra gauta, sujungus pelės V domeną su konstantiniu (pastoviuoju) (C) žmogaus imunoglobulinų domenu. Naujieji antikūnai rodė laukiamas surišimo ir efektorines funkcijas. Humanizuoti antikūnai pasižymi sumažintu šeimininko (žmogaus) imuniniu atsaku, o bifunkciniai imunoglobulinai yra panaudojami vėžio terapijoje ir diagnostikoje.

Viengrandžiai antikūnai ir sulieti baltymai, turintys antikūnų specifiškumą (variabilias sritis) ir sujungti su neimunoglobulininėmis sekomis, yra perspektyvus modifikuotų antikūnų su naujomis savybėmis šaltinis [Sandhu, Crit Rev Biotechnol. 1992;12; pp. 437-462].

Maynard ir kiti pranešė apie didelio afiniškumo viegrandžių antikūnų (scFv), neutralizuojančių *Bacillus anthracis* toksiną, sukonstravimą [Maynard et al., Nature Biotechnol. 2002, 30, pp. 597-601]. Injekuojant šiuos scFv pelėms jos tapo apsaugotos nuo letalaus *B.anthraxis* toksino efekto. Neutralizuojantys žmogaus antikūnai prieš Shiga toksiną 1 buvo gauti, naudojant transgenines peles [Mukherjee et al., Infect. Immun. 2002, 70, pp. 5896-5899]. Buvo gauti ir charakterizuoti neutralizuojantys scFv prieš skorpiono toksiną II [Mousli et.al., FEBS Lett. 1999, 442 pp. 183-188].

Neseniai rekombinantinis vaginolizinas iš *G.vaginalis* buvo gautas naudojant genų inžinerijos metodus [Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KLT et al., J Bacteriol, 2008, 190, pp. 3896-3903]. Hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus prieš VLY, buvo gautos šios paraiškos autorių [Zvirbliene A, Pleckaityte M, Lasickiene R, Zvirblis G, Toxicon, 2010, 56, pp.19-28]. Keli monokloniniai antikūnai, produkuojami hibridominių klonų 9B4 ir 23A2, rodė VLY citolitinio aktyvumo neutralizaciją *in vitro* [WO 2010/095917].

Viengrandžiai antikūno fragmentai (scFv), specifiški VLY citolizinui ir neutralizuojantys jo aktyvumą, nėra sukonstruoti ir aprašyti anksčiau. Nors šio išradimo viengrandžiai antikūno fragmentai yra kilę iš 9B4 hibridomos klonų, kuris aprašytas anksčiau [WO 2010/095917], tačiau aprašyti pilno ilgio pelės monokloniniai antikūnai skiriasi nuo scFv tiek struktūriškai, tiek ir funkciškai.

Dabartiniu metu yra akivaizdus poreikis efektyvioms citolitinio VLY aktyvumo neutralizavimo priemonėms, kurių suradimas yra šio išradimo uždavinys. Problema gali būti išspręsta sukonstruojant VLY surišantį rekombinantinį scFv, kuris galėtų atpažinti natyvų vaginoliziną iš *G.vaginalis* ir neutralizuotų jo sukeltą ląstelių lizę. Viengrandžių antikūno fragmentų (scFv) privalumas prieš monokloninius antikūnus yra tame, kad scFv yra gaunami žymiai paprasčiau ir pigiau (bakterinės biosintezės būdu). Be to viengrandis antikūno fragmentas turi mažesnę molekulinę masę, kas apsprendžia efektyvesnį jo patekimą į infekuotus audinius ir stipresnį terapinį poveikį. Išradime aprašomas rekombinantinis scFv gali būti naudojamas kaip potencialus terapinis agentas gydyti bakterijų *G.vaginalis* sukeltus patogeninius efektus.

Išradimo esmė

Siūlomo išradimo tikslas - gauti naują viengrandžio rekombinantinio antikūno fragmentą scFv, neutralizuojantį VLY citolitinį aktyvumą. Šis išradimas pateikia rekombinantinį scFv gautą, naudojant genetinę medžiagą iš hibridomos ląstelių linijos 9B4 (DSM ACC2991), gaminančios neutralizuojančius monokloninius antikūnus prieš VLY [WO 2010/095917].

Pateikiamas išradimas parodo, kad sukonstruotas scFv atpažįsta VLY ir neutralizuoja pastarojo biologinį aktyvumą, būtent, slopina VLY savybę indukuoti žmogaus eritrocitų hemolizę.

10

Pateikiamas išradimas, kuriame rekombinantinio viengrandžio antikūno fragmentas scFv atpažįsta tokią amino rūgščių seką (SEQ ID: NO.1):

MNNTKFYRNAAMLLLAGATIIPQCLAAPAMAAPAAKDSEPTASCAAKKDSLNNYL
WDLQYDKTNILARHGETIDNKFSSDSFNKGDEFVVVEHQKKNITNTTSNLSVTS
15 NDDRVPYVPGALFRADQNLMDNMPSLISANRAPITLSVDLPGFHGGESAVTVQRPT
KSSVTSVAVNGLVSKWNAQYAASHHVAARMQYDSASAQSMSQLKAKFGADFAKI
GVPLKIDFDAVHKGEKQTQIVNFKQTYTYSVDAPDSPADFFAPCTTPESLKSRG
VDSKRPPVYVSNVAYGRSMYVKFDTRSKSTDFQAAVEAAIKGVEIKPNTFEHRIL
QNTSVTAVILGGSANGAAKVITGNVDTLKALIQEGANLSTSSPAVPIAYTTSFVKD
20 NEVATLQTNVDYVETKVSSYRDGYLTLDHRGAYVARYYYIWDEYGTIDGTPYV
RSRAWEGNGKYRTAHFNNTTIQFKGNVHNLRIKLVEKTGLVWEPWRTVYDRSDLP
LVRQRTIKNWGTTLWPRVAETVKN

arba panašias amino rūgščių sekas, kurių identiškumas yra bent 95%.

25 Toks antikūno fragmentas turi aminorūgščių seką (SEQ ID: No. 2):

DIVMTQTTSHLSVSLGDRVTIACKASAHINNWLAWYQQKPGNAPSLIAGATGLET
GVPSRFSGSGSGKDFTLSSISLQTEDVATYYCQYWDTPYTFGGGKLEIRGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLEQSGPGLVAPSESLTITCTVSGFSLNSYGVH
WVRQPPGKGLEWVGVMWAGGNTSYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQT
30 DDTAIYYCARARGAMDYWGQGTSTVTVSS

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

Antikūno fragmentas pagal siūlomą išradimą yra skirtas naudoti vaginolizino biologinio aktyvumo slopinimui arba neutralizacijai.

35

Kitas išradimo objektas yra gaunamas iš rekombinantinio viengrandžio antikūno fragmento preparatas, skirtas naudoti vaginolinio biologinio aktyvumo slopinimui arba neutralizacijai.

- 5 Šis preparatas yra skirtas naudoti infekcijos, tokios kaip *Gardnerella vaginalis* bakterijų sukelta bakterinė vaginozė, slopinimui. Tai yra, pateikiamo išradimo galima taikymo sritis yra scFv preparatų panaudojimas *G.vaginalis* sukeltos bakterinės vaginozės gydymui. Preparatai, turintys tokį aktyvumą, yra tinkami biofarmacinių rekombinantinių antikūnų gamybai ir potencialiam terapiniam
- 10 panaudojimui.

- Dar vienas išradimo objektas yra farmacinės kompozicijos, sudarytos iš efektyvaus šio išradimo preparato kiekio kombinacijoje su farmaciškai priimtinais nešikliais, skiedikliais, ekscipientais ar/ir pagalbinėmis medžiagomis, skirtomis
- 15 pasekmių, sukeltų *G.vaginalis* infekcijos, profilaktikai ir/arba gydymui. Konkrečiau, šio išradimo farmacinių kompozicijų galima taikymo sritis apima patologijas, sukeliančias priešlaikinį gimdymą, kuris lemia žemą naujagimių svorį, dubens uždegimo ligas, endometritą ir kitas ligas sukeltas *G.vaginalis* infekcijos.

Trumpas brėžinių aprašymas:

- 20 Rekombinantinio antikūno fragmento (scFv) specifiško citoliziniui VLY gavimas yra iliustruotas Fig. 1-5:

Fig.1 iliustruoja konstrukcijos VL-(G₄S)₄-VH, apimančios antikūno fragmentą (scFv), specifšką VLY citoliziniui schematinį vaizdą. Linkeris (jungtukas) yra (G₄S)₄.

- 25 Fig. 2 parodo rekombinantinio antikūno fragmento (scFv) elektroforezės vaizdą transformuotų *E.coli* ląstelių lizate. Iš NDS-PAGE matyti, kad scFv baltymas aptiktas netirpioje transformuotų *E.coli* ląstelių frakcijoje.

1 takelis – tirpi *E.coli* ląstelių frakcija;

2 takelis – netirpi *E.coli* ląstelių frakcija;

- 30 3 takelis – bendras *E.coli* ląstelių lizatas;

4– dažytas baltymų molekulinės masės standartas (kDa).

Fig. 3 parodo išgryninto rekombinantinio antikūno fragmento (scFv) elektroforezės poliakrilamide vaizdą.

1 takelis – 4 µg išgryninto scFv baltymo.

2, 3 takeliai – 10 µg išgryninto scFv baltymo iš dviejų skirtingų gryninimų.

5 M-molekulinės masės markeriai (nuo apačios 15, 20, 25, 30, 40, 50 kDa).

Fig. 4 parodo rekombinantinio antikūno fragmento scFv sąveiką su citolizinu VLY naudojant ELISA metodą. Rekombinantinio antikūno fragmento scFv reaktyvumas su citolizinu VLY naudojant ELISA metodą (kvadratai); teigiama kontrolė pilno ilgio monokloninio antikūno 9B4 reaktyvumas su citolizinu VLY (trikampiai).

10 Fig. 5 parodo rekombinantinio antikūno fragmento scFv eritrocitų hemolizės neutralizavimo aktyvumą, esant citolizinui VLY.

scFv neutralizuojantis aktyvumas įvertintas žmogaus eritrocitų hemolizės tyrimu.

Teigiama kontrolė yra pilno ilgio 9B4 monokloninis antikūnas. Y ašyje parodytos OD reikšmės. X ašyje reakcijos yra pažymėtos numeriais:

- 15 1) 5 ng/ml VLY ir 20 ng/ml 9B4 antikūno PBS tirpale;
- 2) 5 ng/ml VLY ir 200 ng/ml 9B4 antikūno PBS tirpale;
- 3) 5 ng/ml VLY ir 1000 ng/ml 9B4 antikūno PBS tirpale;
- 4) 5 ng/ml VLY and 500 ng/ml scFv PBS tirpale;
- 5) 5 ng/ml VLY and 1000 ng/ml scFv PBS tirpale;
- 20 6) 5 ng/ml VLY and 2000 ng/ml scFv PBS tirpale;
- 7) 5 ng/ml VLY and 5000 ng/ml scFv PBS tirpale;
- 8) 5 ng/ml VLY and 10000 ng/ml scFv PBS tirpale.

Detalus išradimo aprašymas

25 Rekombinantinio antikūno fragmento scFv konstravimas buvo pradėtas nuo genetinės medžiagos (RNR) išskyrimo iš hibridomos 9B4 (DSM ACC2991). Buvo naudotos tokios procedūros:

- 1) RNR išskyrimas iš hibridomos 9B4 – totalinė RNR buvo išskirta iš hibridomos 9B4 (DSM ACC 2991) ląstelių naudojant vienos stadijos techniką kaip aprašyta anksčiau [Chomczynski and Sacchi, Anal Biochem, 1987, 162, pp. 156-159]. Ląstelių homogenatas gaunamas, naudojant guanidino tiocianatą, o RNR

ekstrahuojama fenolio-chloroformo mišiniu, esant rūgštiniam pH. RNR toliau yra nusodinama izopropanoliu.

2) Pirmosios kDNR grandinės sintezė – pirmoji kDNR grandinė yra sintetinama naudojant RNR-priklausomą DNR polimerazę (atvirkštinę transkriptazę), kartu su
5 matrica poli(A)⁺RNR ir pradmenimis oligo(dT) nukleotidais .

3) Galutinė kDNR buvo amplifikuota, naudojant PGR ir specifinius pradmenis imunoglobulinų variabilaus (kintamo) domeno sekoms.

Pelių imunoglobulinų sunkiosios grandinės pastovios srities pradmenį:
5'-TTAATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC ir pelės imunoglobulino
10 sunkiosios grandinės FR1 srities stipriai degeneruotą pradmenį: 5'-
CATATGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (R – pažymi A/G; S – C/G; N – A, C, G,
T). Pelės kapa grandinės imunoglobulinų pastoviosios srities pradmenį: 5'-
TTAGGATACAGTTGGTGCAGCATC ir pelės kapa grandinės imunoglobulinų
pastovaus FR1 regiono universalų degeneruotą pradmenį: 5'-
15 CATATGGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (R – pažymi A/G; S – C/G; W –
A/T; M – A/C; Y – C/T).

4) PGR produktai buvo klonuoti į vektorinę plazmidę ir nukleotidų seka buvo nustatyta sekoskaitos būdu. Sekos analizuotos, naudojant BLASTN programą ir GenBank bei IgBLAST duomenų bazes.

20 5) Buvo sukonstruotas scFv fragmentas, įvedant linkerinę (jungtuko) seką (G₄S)₄ tarp domeno VL (variabilios (kintamos) pelių imunoglobulinų lengvosios grandinės L srities) ir domeno VH (variabilios (kintamos) pelės imunoglobulino sunkiosios grandinės H srities). Galutinė konstrukcija koduojanti VL-(G₄S)₄-VH buvo įklonuota į ekspresijos vektorių pET28a(+) [Merck, Darmstadt, Vokietija].
25 Konstrukcija scFv apima (His)₆ inkarinę seką baltymo N-gale. Galutine plazmide buvo transformuotas *E.coli* BL21(DE3) kamienas. Rekombinantinio scFv biosintezė buvo indukuota 0.5 mM IPTG.

6) Nustatyta tokia scFv amino rūgščių seka (SEQ ID: NO.2):

30 DIVMTQTTSHLSVSLGDRVTIACKASAHINNWLAWYQQKPGNAPSLLIAGAT
GLETGVPSRFSGSGSGKDFTLSSISLQTEDVATYYCQQYWDTPYTFGGGT
KLEIRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLEQSGPGLVAPSESLTITCTVS
GFSLSYGVHWVRQPPGKGLEWVGVMWAGGNTSYNSALMSRLSISKDNS
KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCARARGAMDYWGQGTSVTVSS

7) Po indukcijos gauti tarpiniai kūneliai su scFv baltymu buvo solubilizuoti naudojant chaotropinius agentus. Oksidacinė renatūracija disulfidinių jungčių formavimuisi buvo atlikta arba skiedimo būdu arba kolonėleje, kaip oksidatorių naudojant redukuoto ir oksiduoto glutationo porą arba divalenčio vario Cu (II) jonus. Renatūruotas scFv baltymas buvo išgrynintas naudojant metalo chelatinę afininę chromatografiją. Kai kurios scFv baltymo savybės aprašytos toliau prie atitinkamų pavyzdžių.

Šiuo išradimu buvo nustatyta, kad rekombinantinis antikūno fragmentas, kilęs iš hibridomos 9B4, atpažįsta amino rūgščių seką SEQ ID: No.1:

MNNTKFYRNAAMLLLAGATIIPQCLAAPAMAAPAAKDSEPTASCAAKKDSLNNYL
WDLQYDKTNILARHGETIDNKFSSDSFNKGDEFVVEHQKKNITNTTSNLSVTSA
NDDRVPYVPGALFRADQNLMDNMPSLISANRAPITLSVDLPGFHGGESAVTVQRPT
KSSVTSAVNGLVSKWNAQYAASHHVAARMQYDSASAQSMSQLKAKFGADFAKI
15 GVPLKIDFDAVHKGEKQTQIVNFKQTYTYSVDAPDSPADFFAPCTTPESLKSRG
VDSKRPPVYVSNVAYGRSMYVKFDTRSKSTDFQAAVEAAIKGVEIKPNTTEFHRIL
QNTSVTAVILGGSANGAAKVITGNVDTLKALIQEGANLSTSSPAVPIAYTTSFVKD
NEVATLQTNDSYVETKVSSYRDGYLTLDRGAYVARYYIYWDEYGTEIDGTPYV
RSRAWEGNGKYRTAHFNTTIQFKGNVHNLRIKLVEKTGLVWEPWRTVYDRSDLP
20 LVRQRTIKNWGTTLWPRVAETVKND.

Ši amino rūgščių seka pilnai atitinka VLY citolizino seką iš *Gardnerella vaginalis*, kuri buvo nustatyta ir paskelbta anksčiau (GenBank Nr. EU697812, EU 697811). Skirtingi *Gardnerella vaginalis* kamienai gali ekspresuoti šiek tiek skirtingus VLY variantus, kurie gali skirtis nuo sekos SEQ ID: No.1 viena arba keliomis amino rūgštimis.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Žemiau pateikiama informacija apie konkrečius pavyzdžius, parodančius, koku būdu buvo gautas rekombinantinis antikūno fragmentas scFv prieš VLY citoliziną bei scFv savybių nustatymo pavyzdžiai. Ši informacija pateikiama iliustratyvumo tikslais ir neapriboja išradimo apimtys.

1 pavyzdys

mRNR išgryninimas iš hibridomos 9B4 ląstelių ir DNR sekos, koduojančios VLY specifinio antikūno fragmentą, klonavimas

Hibridomos 9B4 (DSM ACC 2991) ląstelės (3×10^6 ląstelių) buvo praplautos steriliu šaltu PBS buferiniu tirpalu ir suardytos tirpale D, turinčiame guanidino tiocianato. RNR išgryninta iš homogenato, panaudojant fenolio-chloroformo mišinį, kurio pH 5. Pridėjus kiekvieną reagentą, tirpalas gerai išmaišomas, mėgintuvėlį apverčiant kelis kartus. Tirpalas laikytas 15 min. lede. Mėgintuvėlis centrifuguotas, ir surinkta apatinė vandeninė fazė, kurioje yra RNR. Pridėtas lygus tūris izopropanolio, tirpalas gerai sumaišytas, ir RNR išsodinta, palaikius 1 val. -20°C temperatūroje. RNR surinkta centrifuguojant, praplauta 75 % etanolio tirpalu, ištirpinta vandenyje, apdorotame DEPC, ir saugota -70°C temperatūroje.

Bendra RNR, išgryninta iš hibridomos 9B4 ląstelių, panaudota kDNR pirmos grandinės sintezei. DNR pėdsakai RNR mėginyje pašalinti, pridėjus fermento DNazės I (be RNazės). Paruošta be DNR priemaišų RNR ($0,5 \mu\text{g}$) sumaišyta su oligo (dT)₁₈ pradmeniu ir inkubuota su fermentu nuo RNR priklausoma DNR polimeraze (atvirkštine transkriptaze). Reakcija sustabdyta, pakaitinus reakcijos mišinį 70°C 5 min. kDNR, koduojanti kintamą monokloninio antikūno iš hibridomos 9B4 sritį, buvo gauta, panaudojus šias specifinių pradmenų poras: 1) pelės sunkiosios grandinės kintamos srities pradmuo: 5'-TTAATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC ir pelės sunkiosios grandinės FR1 srities išsigimęs pradmuo: 5'-CATATGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (R – A/G; S – C/G; N – A, C, G, T); 2) pelės kapa grandinės pastoviosios srities pradmuo: 5'-TTAGGATACAGTTGGTGACGATC ir pelės kapa grandinės FR1 srities universalus išsigimęs pradmuo 5'-CATATGGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (R – A/G; S – C/G; W – A/T; M – A/C; Y – C/T). Kiekviename PGR reakcijos mišinyje yra: kDNR (pirma grandinė), 5' ir 3' pradmenys, dNTP, Taq polimerazė. Gautas PCR produktas išgrynintas iš agarozės gelio ir klonuotas į pJET1.2 klonavimo vektorių (Fermentas, Vilnius, Lietuva). Liguota DNR transformuotos E.coli DH10B ląstelės ir išbraukytos ant LB agarą su $100 \mu\text{g/ml}$ ampicilino. Kolonijos išaugintos nuo agarą lėkštelių, iš jų išgrynintos plazmidės ir restriktinės analizės būdu patikrinta, ar plazmidės turi reikiamą DNR intarpą. Intarpų

nukleotidų seka nustatyta sekoskaitos būdu. Kiekvienai IgG grandinei nustatyta nukleotidų tarpų seka iš penkių klonų ir aptikta, jog sekos yra vienodos. Jungtuko seka, koduojanti (G₄S)₄, ir restrikcijos endonukleazų taikiniai įterpti, panaudojus PGR. DNR fragmentai, koduojantys VL ir VH, buvo sulieti ir gauta genetinė konstrukcija, koduojanti amino rūgščių seką VL-(G₄S)₄-VH, schematiškai parodytą Fig.1.

2 pavyzdys

Raiškos plazmidžių konstravimas ir rekombinantinio scFv raiška E.coli ląstelėse.

DNR fragmentas, koduojantis VL-(G₄S)₄-VH, klonuotas į raiškos vektorių pET28(+). Gautą raiškos plazmidę pET28, turinčią scFv, transformuotos E.coli BL21(DE3) ląstelės, ir transfekuotos bakterijos išbraukytos ant LB agarų lėkštelių su 25 µg/ml kanamicino. Ląstelės, transformuotos raiškos plazmide, augintos 500 ml LB terpės su kanamicinu. Ląstelių kultūrai pasiekus OD₆₀₀ 0,8-1,0, tikslinio geno raiška pradėta, pridėjus iki 0,5 mM IPTG (izopropilo β-D-tiogalaktozidas). Ląstelės augintos 2,5 val. 37°C temperatūroje ir surinktos centrifuguojant. Dalis ląstelių suspenduota Tris-EDTA (TE) buferiniame tirpale ir suardytos ultragarsu. Suardytos ląstelės centrifuguotos, o supernatantas (tirpi ląstelių frakcija) ir nuosėdos (netirpi ląstelių frakcija) analizuotos 12% natrio dodecilsulfato - poliakrilamido gelio elektroforeze (NDS-PAGE). Gelis nudažytas dažu Coomassie Blue. 27,5 kDa tikslinis baltymas scFv aptiktas netirpioje E.coli ląstelių frakcijoje (Fig. 2). Tikslinis baltymas sudarė apie 35 % nuo bendrų ląstelės baltymų ir apie 80 % nuo netirpių ląstelės baltymų. Gauti rezultatai rodo, kad E.coli ląstelėse gaminamas scFv patenka į tarpinius kūnelius.

3 pavyzdys

Rekombinantinio scFv gryninimas

E.coli biomasė su tiksliniu baltymu scFv buvo homogenizuota 100 ml (santykiu 1:10, biomasė:buferinis tirpalas) 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, esant 5 mM EDTA 0,1 g lizocimo, 0,1 ml Triton X-100, 1,0 ml 100 mM fenilmetilsulfofluorido (PMSF) ir 0,7 ml 2-merkaptoetanolio. Homogenizatas buvo maišomas 30 min. kambario

temperatūroje, laštelės suardytos ultragarsu ir nucentifuguotos 25 min., 24.500g. Likusios nuosėdos du kartus praplautos 100 ml 1 M NaCl, 0.1% Tween 80 ir 100 ml distiliuotu vandeniu. Po kiekvieno plovimo ciklo suspensija centrifuguota 25 min., 24.500g.

- 5 Oksidacinė renatūracija: Nuosėdos, gautos po paskutinio plovimo ir turinčios scFv baltymą, tirpinamos 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 buferiniame tirpale, turinčiame 7M guanidino hidrochlorido. Suspensija maišoma per naktį 4°C, centrifuguojama 25 min. 40,000g ir supernatantas skiedžiamas 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 7.0), turinčiu 6 M GuHCl iki bendro baltymo koncentracijos 1 mg/ml, po to
- 10 pridedamas CuSO₄ tirpalas iki 20 µM koncentracijos. Renatūracija vykdoma apie 1 valandą kambario temperatūroje. Reakcija stabdoma, pridedant EDTA tirpalo iki 10mM galutinės koncentracijos. Baltymų tirpalas centrifuguojamas 25 min. 40.000g ir sorbuojamas ant Sephadex G-25 kolonėlės, nupusiausvyrintos 25 mM TRIS buferiniu tirpalu, pH 8,0, turinčiu 0,25M Na₂SO₄. Tikslinį baltymą turinčios
- 15 frakcijos surenkamos, apjungiamos ir sorbuojamos ant Ni (II) NTA sorbentu pakrautos kolonėlės. Naudotas sorbcijos buferinis tirpalas 25 mM TRIS, pH 8,0, o desorbcija atliekama tuo pačiu buferiniu tirpalu su 1M imidazolo. Tikslinį baltymą turinčios frakcijos apjungiamos, dializuojamos prieš 20 mM TRIS, 50mM NaCl, pH 8,0 ir filtruojamos 0,22µm filtru tolimesniam saugojimui. Išgryninto rekombinantinio
- 20 scFv NDS-PAGE elektroforezė parodyta Fig.3.

Stabilus baltyminis preparatas, gaunamas pervedant išgrynintą antikūno fragmentą scFv į saugojimui tinkamą tirpalą (formuluotę), susidedančią iš parinktos buferinės sistemos, baltymo stabilizacijai ir izotoniškumui palaikyti reikalingų druskų, detergentų, antioksidantų ir kitų pagalbinių medžiagų.

- 25 Apskaičiuota baltymo scFv molekulinė masė yra 25,182 kDa, teorinis izoelektrinis taškas pI yra 6,99. Eksperimentiškai nustatyta (pagal NDS-PAGE) molekulinė masė yra apie 25,5 kDa. Fluorescenciniu metodu nustatyta scFv baltymo lydymosi (denatūracijos) temperatūra T_m yra apie 55°C, naudojant citratinio buferinio tirpalo sistemą. Papildomai baltymo identiškumo nustatymas buvo patvirtintas
- 30 imunoblotingo (WB) ir imunofermentinės analizės (ELISA) metodais, naudojant sąveiką su antigenu (VLY).

4 pavyzdys

Rekombinantinio scFv specifiškumo nustatymas

Rekombinantinio scFv, kilusio iš hibridomos 9B4, specifiškumas nustatytas naudojant imunofermentinės analizės metodą (ELISA). Rekombinantinis išgrynintas scFv buvo praskiestas ir išpilstytas į 96-šulinėlių plokštelę, padengtą rekombinantiniu VLY baltymu. Po vienos val. inkubacijos kambario temperatūroje VLY-surištas scFv buvo nustatytas, inkubuojant su pelės monokloniniu antikūnu prieš (His)₅ seką ir krienų peroksidaze (HRP) pažymėtu antriniu antikūnu (IgG konjugatu prieš pelės imunoglobulinus). Fermentinė reakcija buvo išryškinta naudojant paruoštą TMB substratą. Optinis tankis buvo matuojamas 405 nm bangos ilgyje. Teigiama kontrolė buvo naudojamas praskiestas pilno ilgio monokloninis antikūnas 9B4, inkubuotas 96-šulinėlių plokštelėje, padengtoje rekombinantiniu VLY baltymu. Plokštelės išryškintos HRP-IgG konjugatu prieš pelės imunoglobulinus ir TMB substratu. Fig.4. iliustruoja rekombinantinio scFv ir pilno ilgio antikūno 9B4 titravimo kreives mikrotitravimo plokštelėse, padengtose rekombinantiniu VLY. Šis eksperimentinis rezultatas parodo rekombinantinio scFv specifiškumą VLY vaginolizinui.

5 pavyzdys

scFv neutralizuojančio aktyvumo tyrimas

Eritrocitų hemolizė in vitro [Cauci S, Monte R, Ropele M et al., Mol Microbiol, 1993, 9, pp. 1143-1155.] panaudota rekombinantinio scFv neutralizuojančio VLY aktyvumui ištirti. Žmogaus eritrocitų suspensija (1 ml) buvo inkubuota 15 min. 22°C temperatūroje šiuose reakcijos mišiniuose:

- 1) Fosfatinis buferinis tirpalas PBS, pH 7,4 (eritrocitų hemolizės nėra);
- 2) Dejonizuotas vanduo (100 % eritrocitų hemolizė);
- 3) PBS su 5 ng/ml VLY (100 % eritrocitų hemolizė);
- 4) 5 ng/ml VLY ir 20 ng/ml 9B4 antikūno PBS tirpale;
- 5) 5 ng/ml VLY ir 200 ng/ml 9B4 antikūno PBS tirpale;
- 6) 5 ng/ml VLY ir 1000 ng/ml 9B4 antikūno PBS tirpale;
- 7) 5 ng/ml VLY and 500 ng/ml scFv PBS tirpale;
- 8) 5 ng/ml VLY and 1000 ng/ml scFv PBS tirpale;

- 9) 5 ng/ml VLY and 2000 ng/ml scFv PBS tirpale;
- 10) 5 ng/ml VLY and 5000 ng/ml scFv PBS tirpale;
- 11) 5 ng/ml VLY and 10000 ng/ml scFv PBS tirpale.

5 Po inkubacijos eritrocitų suspensija centrifuguota 3 min., 1000xg ir pamatuotas tirpalo optinis tankis OD, esant 415 nm bangos ilgiui. Didelės optinio tankio reikšmės ($OD > 2,0$) rodo, kad įvyko eritrocitų hemolizė. Mažos OD reikšmės ($OD < 0,2$) rodo, kad eritrocitai buvo apsaugoti nuo suardymo. Į eritrocitų suspensiją pridėjus 5 ng/ml rekombinantinio VLY, eritrocitai buvo pilnai suardyti ($OD = 2,5$). Kai
10 į mišinį buvo pridėta 20 ng/ml 9B4 antikūno ar 5000 ng/ml rekombinantinio scFv, eritrocitai buvo pilnai apsaugoti nuo hemolizės (Fig. 5). Gauti rezultatai rodo, jog tiek pilno ilgio 9B4 antikūnas, tiek rekombinantinis scFv neutralizavo VLY citolitinį aktyvumą. 9B4 antikūnas pasižymėjo didesniu neutralizuojančiu aktyvumu nei scFv, nes VLY neutralizacijai jo reikėjo mažesnės koncentracijos.

15

Farmacine kompozicija su scFv baltymu pagal šį išradimą gali savo sudėtyje turėti vieną arba kelis tokių komponentų:

- nešiklį, kuris gali būti polihidroksiliai alkoholiai (pvz. manitolis, sorbitolis), įvairūs monosacharidai (pvz. gliukozė), disacharidai (pvz. sacharozė);
- 20 – buferinę substanciją reikiamos pH reikšmės palaikymui (pvz. acetatas, fosfatas, TRIS, HEPES);
- druskų priedus kompozicijos izotoniškumui palaikyti (pvz. natrio chloridas);
- detergentą, apsaugantį nuo baltymo degradacijos skystis-oras skiriamoje riboje, (pvz. polisorbata 80, polisorbata 20, įvairūs Pluronic tipo junginiai);
- 25 – stabilizatorių, tokį kaip polietilenglikoliai, polivinilpirolidonai, amino rūgštys (pvz. L-metioninas, L-argininas, L-histidinas, L-glutathiono rūgštis, L-asparagino rūgštis);
- chelatuojantį agentą, tokį kaip EDTA, EGTA, IDA;
- antimikrobinį agentą (pvz. benzolo dariniai, tokie kaip krezolas, benzilo
30 alkoholis);
- SH agentą (pvz. gliutathionas, cisteinas, acetilcisteinas)
- kitas tinkamas pagalbines medžiagas.

Apibendrinant gautus duomenis išryškėja, kad rekombinantinis antikūno fragmentas scFv, kilęs iš hibridomos 9B4, pasižymi specifiskumu VLY citoliziniui iš *G.vaginalis* bakterijų ir efektyviai neutralizuoja pastarojo citolitinį aktyvumą. Dėl to šis rekombinantinis antikūno fragmentas scFv gali būti naudojamas terapiniais ir profilaktiniais tikslais gydant patologijas, sukeltas *G.vaginalis* infekcijos, arba išvengiant jų. Gauti viengrandžiai antikūno fragmentai (scFv) atskleidė privalumus prieš monokloninius antikūnus, gaminant scFv paprastesniu ir pigesniu bakterinės biosintezės būdu. Be to maža scFv molekulinė masė potencialiai lemia stipresnį terapinį poveikį dėl efektyvesnio scFv patekimo į infekuotus audinius.

10

Dar daugiau, panaudojant gautas DNR sekas, koduojančias scFv, gali būti sukonstruoti naujos struktūros humanizuoti antikūnai, kurie galės neutralizuoti VLY citolizino biologinį aktyvumą. Kadangi VLY yra pagrindinis *G.vaginalis* virulentiškumo faktorius, jo neutralizavimas gali būti efektyvus kelias gydyti infekcijos sukeltą patologiją.

15

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Rekombinantinis viengrandžio antikūno fragmentas, atpažįstantis aminorūgščių seką SEQ ID: NO.1:

5 MNNTKFYRNAAMLLLAGATIIPQCLAAPAMAAPAAKDSEPTASCAAKKDSLNNYL
WDLQYDKTNILARHGETIDNKFSSDSFNKGDEFVVVEHQKKNITNTTSNLSVTS
NDDRVYPGALFRADQNLMDNMPSLISANRAPITLSVDLPGFHGGESAVTVQRPT
KSSVTSAVNGLVSKWNAQYAASHHVAARMQYDSASAQSMSQLKAKFGADFAKI
GVPLKIDFDAVHKGEKQTQIVNFKQTYTYSVDAPDSPADFFAPCTTPESLKSRG
10 VDSKRPPVYVSNVAYGRSMYVKFDRSKSTDFQAAVEAAIKGVEIKPNTEFHRIL
QNTSVTAVILGGSANGAAKVITGNVDTLKALIQEGANLSTSSPAVPIAYTTSFVKD
NEVATLQTNSDYVETKVSSYRDGYLTLDHRGAYVARYYIWDEYGTEIDGTPYV
RSRAWEGNGKYRTAHFNNTTIQFKGNVHNLRIKLVEKTGLVWEPWRTVYDRSDLP
LVRQRTIKNWGTTLWPRVAETVKND

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

2. Antikūno fragmentas pagal 1 punktą, turintis aminorūgščių seką SEQ ID: No. 2:
DIVMTQTTSHLSVSLGDRVTIACKASAHINNWLAWYQQKPGNAPSLLIAGATGLET
GVPSRFSGSGSGKDFTLSSISLQTEDVATYYCQQYWDTPYTFGGGTKLEIRGGG
20 GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLEQSGPGLVAPSESLTITCTVSGFSLNSYGVH
WVRQPPGKGLEWVGVMWAGGNTSYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQT
DDTAIYYCARARGAMDYWGQGTSTVTVSS
arba į ją panašią seką, kurios homologiškumas yra bent 95%.

25 3. Antikūno fragmentas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, skirtas naudoti vaginolizino biologinio aktyvumo slopinimui arba neutralizacijai.

4. Preparatas, apimantis rekombinantinį viengrandį antikūno fragmentą pagal bet
kurį iš 1-2 punktų, skirtas naudoti vaginolizino biologinio aktyvumo slopinimui arba
30 neutralizacijai.

5. Preparatas pagal 4 punktą, skirtas naudoti infekcijos, tokios kaip *Gardnerella vaginalis* bakterijų sukelta bakterinė vaginozė, slopinimui.

35 6. Farmacinė kompozicija, apimanti preparato pagal 4 punktą efektyvų kiekį derinyje su farmaciniu požiūriu priimtinu nešikliu, skiedikliu, ekscipientu ir/arba pagalbinėmis medžiagomis.

7. Farmacinė kompozicija pagal 6 punktą, skirta naudoti buklių, sukeltų
40 *Gardnerella vaginalis* infekcijos, profilaktikai ir/arba gydymui.

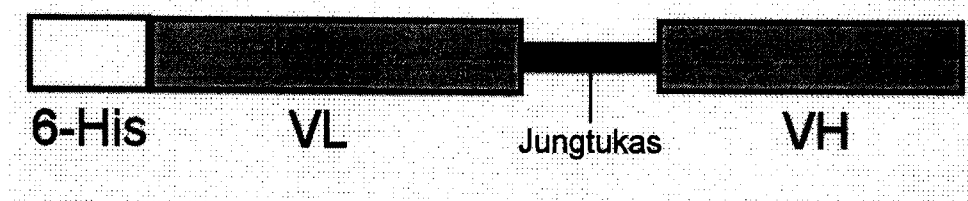


Fig. 1

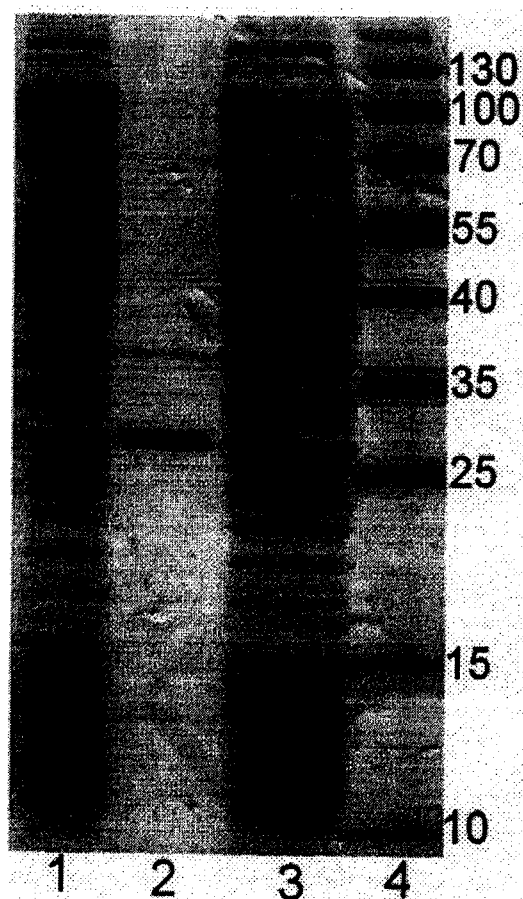


Fig. 2

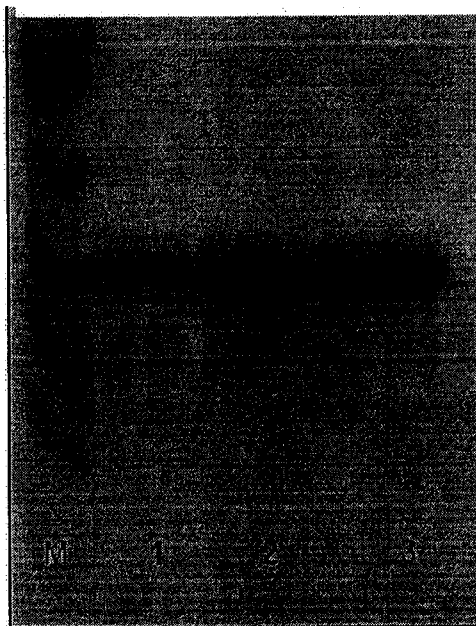


Fig. 3

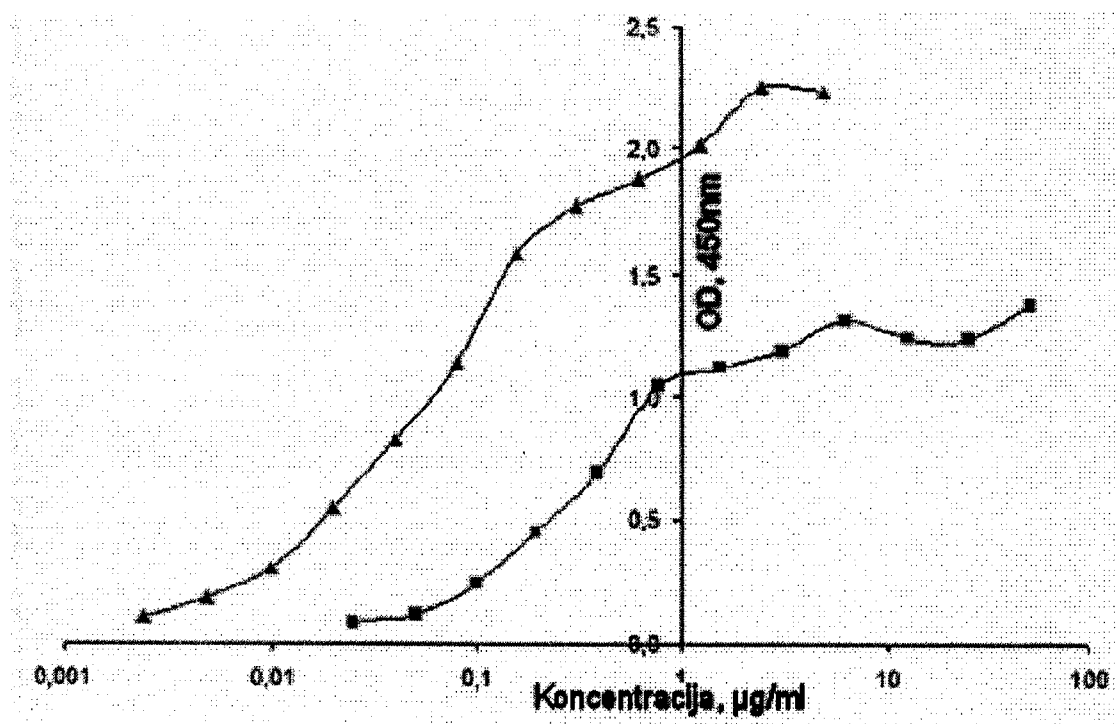


Fig. 4

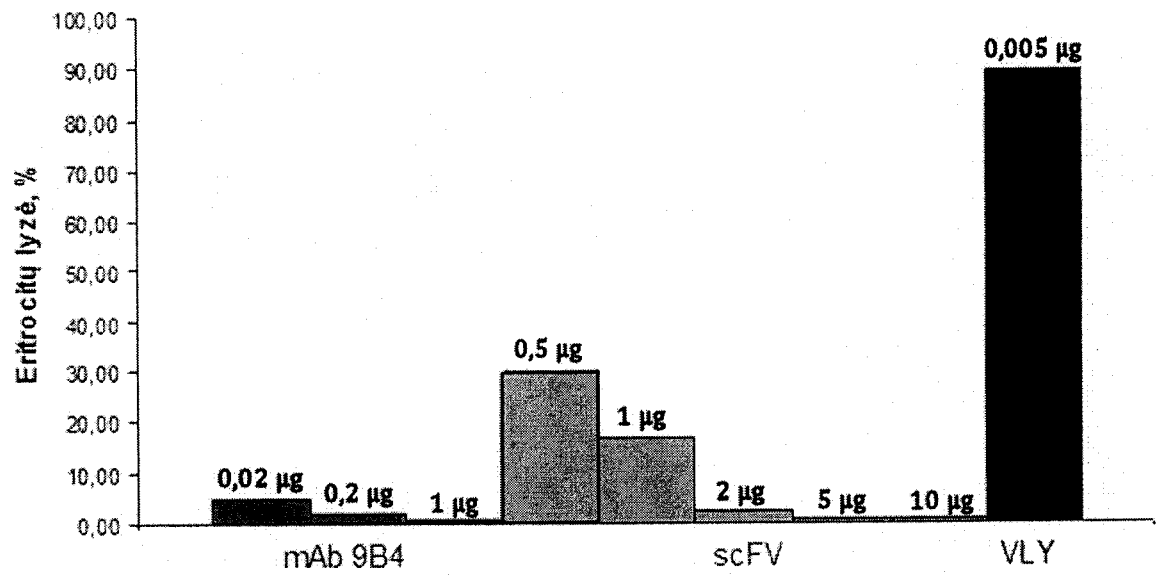


Fig. 5