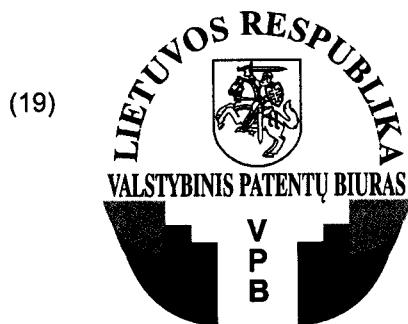




(10) **LT 6331 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **6331**

(51) Int. Cl. (2016.01): **C07K 16/00**

(21) Paraiškos numeris: **2014 140**

C12N 5/00

C12N 15/00

A61K 39/00

(22) Paraiškos padavimo data: **2014-12-12**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2016-06-27**

(45) Patent paskelbimo data: **2016-11-10**

(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:

Dovilė DEKAMINAVIČIŪTĖ, LT

Milda PLEČKAITYTĖ, LT

Daumantas MATULIS, LT

Aurelija ŽVIRBLIENĖ, LT

(73) Patent savininkas:

VILNIAUS UNIVERSITETAS, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Otilija KLIMAITIENĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Naujas rekombinantinis antikūnas prieš žmogaus karboanhidrazę XII

(57) Referatas:

Sukurtas naujas rekombinantinis antikūnas, kurio taikiny yra transmembraninis fermentas karboanhidrazė XII. Šio fermento raiška padidėja tam tikrų tipų vėžinėse ląstelėse. Sukurtasis rekombinantinis antikūnas yra naujas baltymas, kuris iki šiol nebuvo aprašytas mokslinėje literatūroje. Pirmiausia buvo sukurta ląstelių (hibridomų) linija, kuri gamina monokloninį antikūną prieš karboanhidrazę XII. Iš hibridomos ląstelių buvo klonuotos kopijinės DNR sekos, koduojančios imunoglobulinų kintamąsias sritis, sukurtos rekombinantinės plazmidės ir gauta rekombinantinio antikūno raiška. Antikūno kūrimui buvo naudojami žinomi metodai – hibridomų technologija, genų inžinerijos metodai, baltymų gryninimo metodai, imunocheminės analizės metodai. Sukurtasis rekombinantinis antikūnas gali turėti pritaikymą medicinos ir biofarmacijos srityse, nes jis gali slopinti vėžinių ląstelių, turinčių karboanhidrazę XII, augimą.

Išradimo sritis

Išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai; jis aprašo rekombinantinio antikūno, kuris atpažįsta ir specifiskai jungiasi prie žmogaus karboanhidrazės XII ir ją neutralizuoja, gavimą bei unikalių imunoglobulino molekulių aminorūgščių sekų, būtinų antikūno-antigeno sąveikai, apibūdinimą.

Išradimo technikos lygis

Karboanhidrazės (CA) yra cinko metalo fermentai randami beveik visuose gyvuose organizmuose, dėl savo katalizuojamos reakcijos svarbos dalyvaujantys įvairiuose fiziologiniuose procesuose. Žmogaus organizme aptikta 15 α -CA šeimos izoformų, kurios paplitusios įvairių organų ir audinių ląstelėse (eritrocituose, žarnyne, riebaliniame audinyje, inkstuose, plaučiuose, virškinamajame trakte, smegenyse, akyse, kapiliarų endotelyje, kepenyse, seilėse) [Gilmour K. M. Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2010, 157, pp.193-197].

CA IX ir CA XII – membraniniai fermentai, kurių raiška padidėja esant vėžiniams pakitimams, ypač susidarius hipoksijos sąlygoms, kurios būdingos kietiems navikams. Dėl šios priežasties CA IX ir CA XII raiška siejama su vėžio vystymusi. Manoma, kad šie fermentai tiesiogiai veikia naviko progresavimą, nes prisideda prie naviko aplinkos rūgštėjimo, viduląstelinio pH reguliavimo – todėl vėžinės ląstelės lengviau išgyvena hipoksijos sąlygomis, gali lengviau metastazuoti. [Kallio H. J Cancer Mol. 2010, 5, pp.73-78].

CA IX šiuo metu pripažintas šviesių inkstų ląstelių karcinomos biožymuo. Šio baltymo raiškos nustatymas yra svarbus inkstų vėžio diagnostikai, kadangi CA IX sintetinamas tik vėžinėse, bet ne normaliose ląstelėse. Taip pat atliekami tyrimai, kuriais stengiamasi parodyti prognostinę fermento vertę, o tai palengvintų numatyti, ar vėžys linkęs metastazuoti, jo atsparumą terapijai ir atsistatymo tikimybę [Tostain J. Eur J Cancer. 2010, 46, pp. 3141-3148].

CA XII yra intensyviai tyrinėjamas fermentas, norint patvirtinti jo, kaip vėžinių ląstelių žymens, vertę. Parodyta, kad CA XII raiška yra susijusi su labiau pažengusia burnos ertmės suragėjusių ląstelių karcinoma, didesniu auglio dydžiu bei blogesnėmis paciento išgyvenamumo prognozėmis [Chien M. H. Oral Oncol. 2012, 48, pp. 417-

423]. Platesni tyrimai reikalingi, norint patobulinti įvairių audinių vėžių diagnostiką, o tai skatina kurti naujus diagnostinius reagentus ir sistemas, skirtas tyrinėti CA XII raišką klinikiniuose mėginiuose.

Monokloniniai antikūnai (MAk) yra itin populiarius diagnostiniai reagentai, taikomi klinikiniuose tyrimuose įvairiose srityse: kraujo grupių, virusinių infekcijų nustatymui, vėžio, kraujagyslių ir širdies ligų diagnostikoje. Šiuo metu sparčiai plečiasi kita svarbi antikūnų (Ak) pritaikymo sfera – imunoterapija. Pelės MAk, taikant genų inžinerijos technologiją, yra pakeičiami taip, kad jų savybės atpažinti antigeną išliktų nepakitusios, tačiau jie nesukeltų imuninio atsako žmogaus organizme. Modifikuoti arba rekombinantiniai antikūnai gali turėti įvairią struktūrą, pavyzdžiui, chimeriniai Ak sudaryti iš pelės MAk variabilaus regiono (V), kuris svarbus atpažįstant antigeną, ir žmogaus imunoglobulino pastovaus domeno (C), atsakingo už efektorines antikūno funkcijas; viengrandžiai Ak fragmentai (scFv), turintys tik antigeną surišančią sritį ir pan. Tokių rekombinantinių antikūnų gamybai naudojamos bakterijos, mielės, augalai, žinduolių ląstelės ar fagų ekspozicijos sistemos [Frenzel A. Front Immunol. 2013, 4, pp. 1-20].

Fig 1. parodo rekombinantinių antikūnų (scFv ir scFv-Fc) schematinę struktūrą ir jų skirtumus nuo pilno IgG klasės imunoglobulino [pritaikyta iš Frenzel A. Front Immunol. 2013, 4, pp. 1-20].

Ak gali aktyvinti imuninę sistemą, sukeliant Ak nulemtą ląstelinį citotoksiškumą (angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), komplemento nulemtą citotoksiškumą (angl. complement-dependent cytotoxicity, CDC)), arba sukelti vėžinės ląstelės apoptozę, sustabdyti proliferaciją, angiogenezę ar sumažinti metastazių plitimą. Dažnai Ak efektas yra padidinamas juos naudojant kartu su chemoterapija ir medžiagomis, kurios aktyvina imuninę sistemą. Geriausi gydymo Ak rezultatai gaunami juos naudojant ankstyvoje ligos stadijoje. Rituximab - Ak atpažįstantis CD20 molekulę – yra pirmasis registruotas chimerinis MAk (1997 m.), naudojamas leukemijai gydyti [Mellstedt H. Drugs Today (Barc). 2003, 39, pp. 1-16].

RENCAREX® (Girentuximab) yra trečios fazės klinikinių tyrimų kandidatas, skirtas gydyti nemetastazuojančias šviesiųjų inkstų ląstelių karcinomas. Girentuximab yra chimerinis MAk, kuris atpažįsta CA IX. Tai vienintelis Ak prieš karboanhidrazes, pasiekęs klinikinius tyrimus.

Rekombinantiniai antikūnai prieš CA XII nėra aprašyti.

Vaistinių preparatų, pagrįstų antikūnais prieš CA XII, taip pat nėra aprašyta.

Lietuvos ir užsienio patentai bei publikacijos, kuriuose aprašyti artimiausi išradimo analogai

Šaltinis	Apibūdinimas
PCT/US2006/046350 (pavadinimas „Carbonic anhydrase ix (g250) antibodies and methods of use thereof“)	Patente aprašomi rekombinantiniai antikūnai prieš žmogaus karboanhidrazę IX, kuri taip pat yra transmembraninis fermentas ir vėžinių ląstelių žymuo, bet skiriasi nuo karboanhidrazės XII pagal amino rūgščių seką, struktūrą ir funkcijas. Aprašytieji antikūnai nereaguoja su žmogaus karboanhidraze XII.
PCT/EP2011/056964 (pavadinimas „Novel antibody to a carbonic anhydrase“)	Patente aprašomi pelės monokloniniai antikūnai prieš karboanhidrazę XII ir pateiktos jų kintamųjų sričių hiperkaičiosios sekos (CDR): trys sunkiosios ir trys lengvosios imunoglobulino grandinių sekos. Aprašytosios antikūnų sekos nesutampa su šiame išradime aprašomo antikūno sekomis.
1) Dekaminaviciute D, Lasickiene R, Parkkila S, Jogaite V, Matulienė J, Matulis D, Zvirbliene A Development and characterization of new monoclonal antibodies against	Šiose publikacijose aprašomos kitos mūsų sukurtos hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus prieš karboanhidrazę XII. Hibridoma 14D6, aprašoma šioje paraiškoje,

human recombinant CA XII. <i>Biomed Res Int.</i> 2014;2014:309307. doi: 10.1155/2014/309307. 2) Dekaminaviciute D, Kairys V, Zilnyte M, Petrikaite V, Jogaite V, Matulienė J, Gudleviciene Z, Vullo D, Supuran CT, Zvirbliene A. Monoclonal antibodies raised against 167-180 aa sequence of human carbonic anhydrase XII inhibit its enzymatic activity. <i>J Enzyme Inhib Med Chem.</i> 2014 Jan 9.	ankstesnėse mūsų publikacijose nepaminėta. Be to, publikacijose minimi tik monokloniniai antikūnai, bet ne rekombinantiniai antikūnai, Monokloniniai antikūnai skiriasi nuo rekombinantinių antikūnų, nes jie kuriami kitais metodais ir turi skirtingą struktūrą.
---	---

Išradimo esmė

Išradimo tikslas – gauti naują rekombinantinį antikūną, atpažįstantį karboanhidrazę XII. Šis išradimas pateikia imunoglobulino sunkiosios ir lengvosios grandinių kintančiųjų sričių hiperkaičiasias sekas (CDR) gautas, naudojant genetinę medžiagą iš 14D6 hibridomos ląstelių linijos, gaminančios natyvų CAXII baltymą atpažįstantį ir neutralizuojantį monokloninį antikūną prieš CA XII.

Toks antikūnas turi

a) aminorūgščių sekas SEQ ID: Nr. 1 (CDR 1), 2 (CDR 2), 3 (CDR 3), kurios apibrėžia sunkiosios grandinės kintančiąją sritį (VH), ir/arba aminorūgščių sekos SEQ ID: Nr. 4 (CDR 1), 5 (CDR 2), 4 (CDR 3), kurios apibrėžia lengvosios grandinės kintančiąją sritį (VL);

arba

b) aminorūgščių sekas iš (a) dalies, kuriose bent viena aminorūgštis yra konservatyviai pakeista kita panašaus poliariškumo aminorūgštimi bet kurioje iš aminorūgščių sekų SEQ ID Nr. 1 – 6.

SEQ ID Nr. 1: GFTFSDYG. Ilgis: 8 aminorūgštys;

SEQ ID Nr. 2: ISNLAYRI. Ilgis: 8 aminorūgštys;

SEQ ID Nr. 3: VRATEYALDY. Ilgis: 10 aminorūgščių;

SEQ ID Nr. 4: RASQDINNYLN. Ilgis: 11 aminorūgščių;

SEQ ID Nr. 5: YTSKLHS. Ilgis: 7 aminorūgštys;

SEQ ID Nr. 6: QQGNTLPFTF. Ilgis: 10 aminorūgščių.

Pateikiamas išradimas parodo, kad antikūnas 14D6 atpažįsta tokią aminorūgščių seką (CA XII baltymo fragmentą nuo 27-valino iki 130-glicino)

SEQ ID: Nr. 7:

VNGSKWTFYFGPDGENSWSKKYPSCGGLLQSPIDLHSDILQYDASLTPLEFQ
GYNLSANKQFLLTNNGHSVKLNLPSDMHIQGLQSRYSATQLHLHWGNPNDPHG

arba panašias aminorūgščių sekas, kurių identiškumas yra bent 95 % [Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]

Antikūnas 14D6 ar jo fragmentas pagal siūlomą išradimą yra skirtas naudoti karboanhidrazės XII biologinio aktyvumo slopinimui arba neutralizavimui. Šis antikūnas gali būti chemiškai arba genetiškai konjuguotas su fermentu, kitu baltymu arba cheminiu junginiu ir naudojamas kaip diagnostinis arba terapinis agentas.

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig 1. parodo rekombinantinių antikūnų (scFv ir scFv-Fc) schematinę struktūrą ir jų skirtumus nuo pilno IgG klasės imunoglobulino [pritaikyta iš Frenzel A. Front Immunol. 2013, 4, pp. 1-20].

Fig. 2 parodo imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantine CA XII susintetinta *E. coli* ir HEK 293 ląstelėse bei HEK 293 ląstelių lizatu.

Fig. 3 atkartoja IFA rezultatus, gautus kaip antigeną naudojant rekombinantinę CA XII susintetintą bakterijose *E. coli* (CA XII bakt.) arba žinduolių ląstelių linijoje HEK 293 (CA XII žind.).

Fig. 4 parodo 14D6 antikūno sąveiką su natyviu baltymu esančiu ląstelės membranoje.

Fig. 5 parodo, kad monokloninis antikūnas atpažįsta baltymo N-gale esančią

aminorūgščių dalį ir jo linijinis epitopas gali būti tarp aminorūgšties valino (27 pozicija) ir aminorūgšties glicino (130 pozicija).

Fig. 6 parodo antikūno 14D6 slopinantį poveikį rekombinantinei CA XII – jo disociacijos konstanta (~42nM) artima klasikinio karboanhidrazių inhibitoriaus acetazolamido Kd (~37,5 nM).

Fig. 7 parodo imunoglobulino sunkiosios (VH) ir lengvosios (VL) grandinių kintančiųjų sričių hiperkaičiųjų regionų (CDR) nukleotidų ir aminorūgščių sekas (pabraukta).

Fig. 8 iliustruoja konstrukcijų VL-(G4S)₄-VH ir VH-(G4S)₄-VL, apimančių antikūno 14D6 kintamosios dalies fragmentus su žmogaus imunoglobulinų Fc fragmentu (atitinkamai scFv-Fc-1 ir scFv-Fc-2), schematinį vaizdą.

Fig. 9 parodo imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu antikūnu, susintetintu HEK 293 ląstelėse.

Detalus išradimo aprašymas

Šiame išradime aprašomas rekombinantinis antikūnas, kurį sudaro monokloninio antikūno prieš karboanhidrazę XII, kurį produkuoja sukurta nauja hibridomų linija 14D6, sunkiosios ir lengvosios grandinių kintančiųjų sričių hiperkaičiosios sekos (CDR). Atlikti tyrimai parodė, kad sukurtasis monokloninis antikūnas 14D6 reaguoja tiek su rekombinantiniais CA XII baltymais, susintetintais bakterijose *E. coli* ar žinduolių ląstelių linijoje HEK 293, tiek su natyvia CA XII, sintetinama įvairių žmogaus vėžinių ląstelių linijų ląstelių membranose. Taip pat buvo parodyta, kad sukurtasis monokloninis antikūnas neutralizuoja rekombinantinio CA XII baltymo biologinį veikimą *in vitro* – blokuoja fermentinę anglies dioksido hidratacijos reakciją.

Šiame išradime siūlomas rekombinantinis antikūnas yra naujas ir skiriasi nuo analogų iš kitų šaltinių bei anksčiau aprašytų monokloninių antikūnų prieš CA XII.

Siekiant sukurti naują hibridomų liniją 14D6, gaminančią monokloninį antikūną prieš CA XII, buvo panaudota rekombinantinė CA XII susintetinta žmogaus embrioninėse inkstų ląstelėse HEK 293 ir atliktos įprastos, žinomos šios srities specialistams procedūros, būtent:

atliekama imunizacija – rekombinantinė CA XII (antigenas) buvo suleidžiamas BALB/c linijos pelėms po oda. Prieš injekciją antigeno tirpalas buvo lygiu tūriu sumaišomas su pilnu Freund'o adjuvantu;

atliekama pakartotinė imunizacija – po 4 savaičių pelėms dar kartą buvo suleidžiama tokia pat antigeno dozė be adjuvanto; prieš imunizuojant antrą kartą iš pelių uodegos kraujagyslės paimama šiek tiek kraujo

atliekama pakartotinė imunizacija – dar po 4 savaičių pelėms dar kartą buvo suleidžiama tokia pat antigeno dozė be adjuvanto. prieš imunizuojant trečią kartą iš pelių uodegos kraujagyslės paimama šiek tiek kraujo, taip pat kraujo paimama ir po 4 savaičių po trečiosios imunizacijos. Žinomą metodu – imunofermentine analize (IFA) – buvo patikrinta ar pelių kraujo serume atsirado antikūnų prieš antigeną.

pelės blužnies hibridizacija – praėjus 5 savaitėms po trečiosios imunizacijos, pele su didžiausiu antikūnų prieš antigeną kiekiu buvo suleista ta pati antigeno dozė be adjuvanto ir po 3 dienų buvo atliekama blužnies ląstelių hibridizacija, suliejant jas su pelės vėžinėmis ląstelėmis – mieloma Sp2/0, suliejimo agentu buvo naudotas polietilenglikolis (PEG) [Sigma, JAV]. Ši ir kitos procedūros buvo atliekamos pagal žinomą procedūrą, naudojamą hibridomų gavimui [Köhler, Milstein, Nature 1975;256, pp. 495-497].

praėjus 2 savaitėms po hibridizacijos ir gavus hibridinių ląstelių klonus (hibridomas) buvo tikrinamas jų specifiškumas, t. y. nustatoma, ar jie gamina antikūnus prieš CA XII. tam buvo naudojamas IFA metodas;

gautos hibridimos buvo charakterizuojamos pagal įvairius požymius:

nustatant jų gaminamų monokloninių antikūnų izotipą;

ištiriant antikūno specifiškumą IFA ir imunoblotingo metodais;

identifikavus hibridomas, kurios gamina monokloninius antikūnus prieš CA XII, jos buvo klonuojamos, padauginamos ir užšaldomos tolimesniam saugojimui;

hibridomų gaminami monokloniniai antikūnai buvo charakterizuojami anksčiau aprašytais būdais:

IFA ir imunoblotingu, naudojant rekombinantinę CA XII kaip antigeną,

tėkmės citometrija, naudojant vėžinių ląstelių linijų ląsteles,

tikrinamas monokloninių antikūnų neutralizuojantis poveikis, naudojant rekombinantinę CA XII.

Aprašytu būdu buvo gauta nauja hibridomų linija, kuri deponuota Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute (Vilnius) Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje:

Hibridoma 14D6, deponavimo numeris CAXII-001, kuri gamina IgG1 poklasio (subtipo) antikūnus prieš CA XII.

Paminėta nauja hibridoma 14D6 produkuoja monokloninį antikūną, iš kurio buvo sukurtas rekombinantinis antikūnas prieš CA XII, kuris ir yra šio išradimo objektas.

Hibridomų produktų charakteristika

Naujos hibridomos 14D6 ir jos gaminamo monokloninio antikūno savybes iliustruoja informacija pateikta Fig. 2-6.

Fig. 2 parodo imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantine CA XII susintetinta *E. coli* ir HEK 293 ląstelėse bei HEK 293 ląstelių lizatu.

Fig. 3 atkartoja IFA rezultatus, gautus kaip antigeną naudojant rekombinantinę CA XII susintetintą bakterijose *E. coli* (CA XII bakt.) arba žinduolių ląstelių linijoje HEK 293 (CA XII žind.). Taip pat tikrintas kryžminis specifiskumas su karboanhidrazės IX izoformos rekombinantiniu HEK 293 ląstelėse susintetintu baltymu.

Fig. 4 parodo 14D6 antikūno sąveiką su natyviu baltymu esančiu ląstelės membranoje. Sąveika buvo tirta srautinės citometrijos metodu naudojant A498 ląstelių liniją (literatūroje patvirtinta, kad šiose ląstelėse yra padidėjusi CA XII raiška) ir HEK 293 ląstelių liniją (šiose ląstelėse CA XII raiška nenustatyta kitais metodais).

Fig. 5 parodo, kad monokloninis antikūnas atpažįsta baltymo N-gale esančią aminorūgščių dalį ir jo linijinis epitopas gali būti tarp aminorūgšties valino (27 pozicija) ir aminorūgšties glicino (130 pozicija).

Fig. 6 parodo antikūno 14D6 slopinantį poveikį rekombinantinei CA XII – jo disociacijos konstanta (~42nM) artima klasikinio karboanhidrazių inhibitoriaus

acetazolamido Kd (~37,5 nM).

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

1 pavyzdys

Hibridomų, gaminančių monokloninius antikūnus prieš karboanhidrazę XII, sukūrimas

Pagrindiniai hibridomų ir MAk gavimo etapai: imunizacija; mielomos ląstelių kultivavimas; ląstelių suliejimas; kraujo serumo surinkimas; hibridinių ląstelių selekcija ir klonavimas; hibridomų kultivavimas in vitro; hibridomų šaldymas/atšildymas ir saugojimas.

Imunizacija

Imunizacijai buvo naudojamos 6 – 8 savaičių BALB/c linijos pelės, augintos Inovatyvios medicinos centre Imunologijos departamente. Rekombinantiniu CA XII baltymu, susintetintu žinduolinėse HEK293 ląstelėse, buvo imunizuotos 3 pelės, suleidžiant po 50 µg antigeno. Atliekama poodinė injekcija. Pirmos imunizacijos metu antigenas buvo ištirpintas fosfatiniame buferiniame tirpale (PBS) ir suspenduotas lygiu tūriu su pilnu Freund'o adjuvantu (PFA). Antra imunizacija atlikta po 28 d., naudojant tokį patį kiekį baltymo, kuris buvo ištirpintas PBS. Po 28 d. pelės imunizuojamos trečią kartą tuo pačiu antigeno kiekiu ištirpintu PBS. Po kiekvienos imunizacijos buvo surinktas pelių kraujas antikūnų kiekiui nustatyti (8 µl kraujo sumaišomi su 192 µl PBS). Pelė, kurios serume antikūnų buvo daugiausiai, praėjus 5 savaitėm po trečiosios imunizacijos, buvo dar kartą imunizuota 50 µg baltymo. Hibridizacija buvo atlikta po 3 dienų nuo paskutinės imunizacijos.

Mielomos ląstelių kultivavimas

Hibridizacijai buvo naudojama Sp2/0 mielomos ląstelių linija, kurios ląstelės neturi fermento hipoksantin-guanin-foforiboziltransferazės, neauga selektyvioje hipoksantino-aminopterino-timidino (HAT) terpėje ir negaminaimunoglobulinų ar jų grandinių. Iki hibridizacijos ląstelės buvo auginamos Dulbecco modifikuotoje Eagl'o

(DMEM) terpėje su 9 % fetalinio veršiuko serumo (FBS), persėtos 3 kartus. Suliejimui buvo naudojamos gyvos, logaritminėje augimo fazėje esančios ląstelės.

Ląstelių suliejimas

Antigenų imunizuotos pelės blužnis buvo steriliai išimta ir sutraiškita, norint gauti blužnies ląstelių suspensiją. Suspenduotos mielomos ir blužnies ląstelės supiltos į vieną mėgintuvėlį santykiu 1:5, tuomet lėtai per minutę sulašintas 1 ml ląstelių suliejimo agento 50 % polietilenglikolio (PEG-4000) tirpalo. Per kitas 3 minutes ląstelės buvo inkubuojamos ir lėtai pridedama 10 ml terpės be serumo. Ląstelės po suliejimo buvo suspenduotos jau paruoštoje selektyvioje HAT terpėje turinčioje 15 % FBS, kurioje auga tik hibridinės ląstelės. Geresniam ląstelių augimui reikalingi makrofagai, kurie hibridizacijos metu buvo surinkti iš pelės pilvo ertmės, pradūrus peritoniumą. Ląstelės sėjamos į sterilias audinių kultūroms skirtas 96 šulinėlių plokšteles, po 150 tūkst. į šulinėlį.

Nesusiliejusios mielomos ląstelės dėl aminopterino veikimo pradeda žūti praėjus kelioms dienoms po hibridizacijos. Makrofagai pradeda fagocituoti jų nuolaužas ir atsirandantys klonai tampa daug geriau pastebimi.

Praėjus 10-12 d po hibridizacijos, hibridinių klonų augimo terpė buvo testuojama imunofermentinės analizės (IFA) metodu, naudojant antigeną, kuriuo buvo imunizuotos pelės. Buvo atrinkti hibridiniai klonai, gaminantys stipriausiai veikiančius antikūnus (tokius, kurių optinis tankis didžiausias), ir išklonuoti ribinio praskiedimo metodu. Po klonavimo dar kartą tikrinamas klonų specifiškumas ir aktyvumas, tuomet jie auginami didesniuose šulinėliuose MAk dauginimui ir ląstelių šaldymui.

Hibridomos kultivuojamos DMEM augimo terpėje, turinčioje 2 mM L-glutamino, 200 µg/ml gentamicino ir 15 % FBS, inkubatoriuje, kurio ore yra 5 % CO₂, 98 % drėgnumas, esant +37 °C temperatūrai.

Buvo gauta keletas hibridomų klonų, gaminančių monokloninius antikūnus prieš karboanhidrazę XII. Buvo ištirtas jų specifiškumas, neutralizuojantis aktyvumas, nustatyti antikūnų izotipai. Hibridoma, gaminanti neutralizuojančius monokloninius antikūnus prieš CA XII buvo pavadinta 14D6 ir deponuota Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto (Vilnius, LT) kolekcijoje.

2 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų specifiškumo tyrimas ir izotipų nustatymas

Fig. 2 parodo imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantine CA XII susintetinta *E. coli* ir HEK 293 ląstelėse bei HEK 293 ląstelių lizatu. Kairėje – denatūruojančios baltymų elektroforezės nuotrauka, dešinėje – imunoblotingo su monokloniniu antikūnu 14D6 nuotrauka (naudota hibridomų augimo terpė, neskiesta).

M takelis –dažytas baltymų molekulinio svorio standartas (kDa);

1 takelis – rekombinantinė išgryninta CA XII susintetinta HEK 293 ląstelėse;

2 takelis – rekombinantinė išgryninta CA XII susintetinta *E. coli* bakterijose;

3 takelis – HEK 293 ląstelių lizatas be CA XII;

Fig. 3 atkartoja IFA rezultatus, gautus kaip antigeną naudojant rekombinantinę CA XII susintetintą bakterijose *E. coli* (CA XII bakt.) arba žinduolių ląstelių linijoje HEK 293 (CA XII žind.). Taip pat tikrintas kryžminis specifiškumas su karboanhidrazės IX izoformos rekombinantiniu HEK 293 ląstelėse susintetintu baltymu. Naudota 3 kartus praskiesta hibridomų augimo terpė.

Fig. 4 parodo 14D6 antikūno sąveiką su natyviu baltymu esančiu ląstelės membranoje. Sąveika buvo tirta srautinės citometrijos metodu naudojant A498 ląstelių liniją (literatūroje patvirtinta, kad šiose ląstelėse yra padidėjusi CA XII raiška) ir HEK 293 ląstelių liniją (šiose ląstelėse CA XII raiška nenustatyta kitais metodais). Kaip pirminiai antikūnai naudoti: 1) juoda linija – 14D6 antikūnas; 2) raudona linija – kontrolinis IgG1 poklasio antikūnas prieš kiaulių parvovirusą, kuris sukurtas Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (neigiama kontrolė). Antriniai antikūnai: komerciniai ožkos antikūnai prieš pelės imunoglobulinus, konjuguoti su FITC (BD Biosciences, JAV). Signalo intensyvumas padidėja dėl FITC švytėjimo ir registruojamas kaip kreivės poslinkis, vykstant antikūno 14D6 sąveikai su A498 ląstelėmis (paveikslas kairėje).

Fig. 5 parodo, kad monokloninis antikūnas atpažįsta baltymo N-gale esančią

aminorūgščių dalį ir jo linijinis epitopas gali būti tarp aminorūgšties valino (27 pozicija) ir aminorūgšties glicino (130 pozicija). Viršuje – CA XII pilno ilgio aminorūgščių sekos palyginimas su #1 fragmento aminorūgščių sekos palyginimu; apačioje – imunoblotingo vaizdas, gautas su CA XII fragmentais, susintetintais *E. coli*. Kairėje – denatūruojančios baltymų elektroforezės nuotrauka, dešinėje – imunoblotingo su 14D6 monokloniniu antikūnu nuotrauka (naudota 5 kartus skiesta hibridomų augimo terpė).

M takelis – dažytas baltymų molekulinio svorio standartas (kDa);

1 takelis – #1 fragmentas, *E. coli* lizatas;

2 takelis – #2 fragmentas, *E. coli* lizatas;

3 takelis – #3 fragmentas, *E. coli* lizatas;

4 takelis – rekombinantinė išgryninta CA XII susintetinta HEK 293 ląstelėse.

3 pavyzdys

CA XII slopinimo tyrimas

Karboanhidrazės fermentinio aktyvumo matavimams buvo naudotas žinduolių ląstelių linijoje pagamintas rekombinantinis CA XII baltymas. CA XII hidratacinis aktyvumas matuotas sustabdytos tėkmės metodu [Khalifah. J Biol Chem 1971, 246, pp. 2561-2673] naudojant "Applied Photophysics SX.18MV-R" spektrofotometrą 25 °C temperatūroje. Indikatoriumi naudotas 30 μM fenolio raudonasis, kurio absorbcija stebėta 557 nm bangos ilgyje, esant 40 nM CA XII, ~17 mM CO₂, 25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7,5 ir skirtingiems kiekiams (0 – 2 μM) antikūno ar mažamolekulinio slopiklio (acetazolamido). Katalizuojamos reakcijos greitis lygintas su savaiminės CO₂ reakcijos greičiu. Prieš matuojant CA XII – antikūno/slopiklio kompleksas inkubuotas ~1 val. 25 °C temperatūroje. Disociacijos konstantos apskaičiuotos taikant Morrison lygtį.

Fig. 6 parodo antikūno 14D6 slopinantį poveikį rekombinantinei CA XII – jo disociacijos konstanta (~42nM) artima klasikinio karboanhidrazių inhibitoriaus acetazolamido K_d (~37,5 nM).

4 pavyzdys.

Antikūno sekų identifikavimas ir rekombinantinio antikūno konstravimas

Rekombinantinio antikūno konstravimas buvo pradėtas nuo monokloninio antikūno sunkiosios ir lengvosios grandinių kintančiųjų sričių hiperkaičiųjų sekų (CDR) identifikavimo ir genetinės medžiagos (RNR) išskyrimo iš hibridomos 14D6. Buvo naudotos tokios procedūros:

1) RNR išskyrimas iš hibridomos 14D6 – totalinė RNR buvo išskirta iš hibridomos 14D6 ląstelių, naudojant vienos stadijos techniką kaip aprašytas anksčiau [Chomczynski and Sacchi, Anal. Biochem., 1987, 162, pp. 156-159; Boom R., J. Clin. Microbiol. 1990, 28 pp. 495–503]. Ląstelės suardomos ir homogenizuojamos buferiniame tirpale su guanidino tiocianatu. Ląstelių lizatas sumaišomas su etanoliu ir užnešamas ant gryninimui skirtų kolonėlių su silicio membrana – prie jos prikimba RNR. Kolonėlė tuomet praplaunama, o gyna RNR atkabinama vandeniu be nukleazijų.

2) Pirmosios kopijinės DNR (kDNR) grandinės sintezė – pirmoji kDNR grandinė yra sintetinama naudojant nuo RNR priklausomą DNR polimerazę (atvirkštinę transkriptazę), kartu su matrica poli(A) iRNR ir atsitiktiniais heksameriniais pradmenimis, naudojant komercinį rinkinį „RevertAid

H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“, [Thermo Fisher Scientific, Vilnius].

3) Galutinė kDNR buvo padauginta polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu, naudojant specifinius pradmenis pelių imunoglobulinų sunkiosios ir lengvosios grandinių variabilaus (kintamojo) domeno sekoms (VH ir VL atitinkamai):

a) Pelių imunoglobulinų sunkiosios grandinės pastovios srities pradmuo 5'-TTAATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC;

b) Pelių imunoglobulinų sunkiosios grandinės FR1 srities stipriai degeneruotas pradmuo 5'-CATATGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (R – žymi A/G; S – C/G; N – A/C/G/T);

c) Pelių imunoglobulinų lengvosios kappa grandinės pastoviosios srities pradmuo 5'-TTAGGATACAGTTGGTGCAGCATC;

d) Pelių imunoglobulinų lengvosios kappa grandinės pastovaus FR1 regiono universalus degeneruotas pradmuo 5'-CATATGGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (R- žymi A/G; S – C/G; W – A/T; M –

A/C; Y – C/T).

4) PGR produktai buvo klonuoti į vektorinę plazmidę ir sekoskaitos būdu buvo nustatyta nukleotidų seka. Sekos analizuotos, naudojant BLASTN, pDRAW32 ir Chromas Lite programas bei GenBank ir IgBLAST duomenų bazes. Buvo nustatytos imunoglobulino sekos SEQ ID: Nr. 1 (CDR 1), 2 (CDR 2), 3 (CDR 3), kurios apibrėžia sunkiosios grandinės kintančiąją sritį (VH), ir aminorūgščių sekos SEQ ID: Nr. 4 (CDR 1), 5 (CDR 2), 4 (CDR 3), kurios apibrėžia lengvosios grandinės kintančiąją sritį (VL) (Fig. 7).

Fig. 7 parodo imunoglobulino sunkiosios (VH) ir lengvosios (VL) grandinių kintančiųjų sričių hiperkaičiųjų regionų (CDR) nukleotidų ir aminorūgščių sekas (pabraukta).

Klonavus iš hibridomos 14D6 šias sekas, buvo sukonstruotas viengrandis antikūno fragmentas (scFv), įvedant linkerinę (jungtuko) seką (G₄S)₄ tarp domeno VL (SEQ ID Nr. 9) ir VH (SEQ ID Nr. 8). Galutinė konstrukcija koduojanti VL-(G₄S)₄-VH arba VH-(G₄S)₄-VL buvo įklonuota į raiškos vektorių pCEP4dS [„FreeStyle Max 293 expression system“, Invitrogen, Life Technologies, Karlsbadas, Kalifornija, JAV]. Konstrukcija apima žmogaus imunoglobulino Fc domeną. Baltymo N-gale yra sekrecijos signalo (SS) seka. Galutine plazmide buvo transfekuotos žmogaus embrioninės inkstų HEK 293 linijos ląstelės. Laikina transfekcija ir baltymo indukcija atlikta pagal gamintojo rekomendacijas.

Fig. 8 iliustruoja konstrukcijų VL-(G₄S)₄-VH ir VH-(G₄S)₄-VL, apimančių antikūno 14D6 kintamosios dalies fragmentus su žmogaus imunoglobulinų Fc fragmentu (atitinkamai scFv-Fc-1 ir scFv-Fc-2), schematinį vaizdą. VH – imunoglobulino sunkiosios grandinės kintančiosios srities hiperkaičiųjų regionas (SEQ ID Nr. 8); VL – imunoglobulino lengvosios grandinės kintančiosios srities hiperkaičiųjų regionas (SEQ ID Nr. 9); (G₄S)₄ – linkeris (jungtukas) tarp VL ir VH, susidedantis iš 4 glicinų ir 1 serino sekos, kuri pasikartoja 4 kartus; Fc – žmogaus imunoglobulino sunkiosios grandinės C-galinė dalis.

Fig. 9 parodo imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu antikūnu, susintetintu HEK 293 ląstelėse. Kairėje – denatūruojančios baltymų elektroforezės nuotrauka, dešinėje – imunoblotingo su polikloniniais triušio antikūnais, atpažįstančiais žmogaus imunoglobulino Fc grandinę, konjuguotais su krienų peroksidaze, skiesti 1000 kartų [Dako, Agilent Technologies, Danija, Glostrupas].

M takelis – dažytas baltymų molekulinio svorio standartas (kDa);

1 takelis – HEK 293 ląstelių, gaminančių rekombinantinį antikūną VL-(G₄S)₄-VH-Fc, lizatas;

2 takelis – HEK 293 ląstelių, gaminančių rekombinantinį antikūną VH-(G₄S)₄-VL-Fc, lizatas;

3 takelis – HEK 293 ląstelių, gaminančių rekombinantinį žmogaus imunoglobulino Fc fragmentą, lizatas;

4 takelis – HEK 293 ląstelių lizatas;

5 takelis – Žmogaus imunoglobulinai IgG iš serumo [Sigma-Aldrich Co., JAV, Misūris, Sent Luisas].

Imunoblotingo vaizdas rodo, kad po transfekcijos ląstelėse HEK 293 vyksta rekombinantinių antikūnų, sudarytų iš konstrukcijų VL-(G₄S)₄-VH ir VH-(G₄S)₄-VL, apimančių antikūno 14D6 kintamosios dalies fragmentus su žmogaus imunoglobulino Fc fragmentu, raiška.

6) Nustatyta tokia antikūno aminorūgščių seka, kuri skiriasi nuo PCT/EP2011/05696 aprašytos antikūno sekos:

14D6 antikūnas	6A10 antikūnas (analogas aprašytas PCT/EP2011/056964)
SEQ ID Nr. 1: GFTFSDYG. Ilgis: 8 aminorūgštys;	1: GFSLTTSVS

SEQ ID Nr. 2: ISNLAYRI. Ilgis: 8 aminorūgštys;	2: RMWYDGDTV
SEQ ID Nr. 3: VRATEYALDY. Ilgis: 10 aminorūgščių;	3: DFGYFDGSSPFDY
SEQ ID Nr. 4: RASQDINNYLN. Ilgis: 11 aminorūgščių;	4: RASQGISTSIH
SEQ ID Nr. 5: YTSKLHS. Ilgis: 7 aminorūgštys;	5: FASQSIG
SEQ ID Nr. 6: QQGNTLPFTF. Ilgis: 10 aminorūgščių.	6: QQTYSLPYTF

Literatūros sąrašas

Gilmour K. M. Perspectives on carbonic anhydrase, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2010;157:193–197.

Kallio H., Martinez A. R., Hilvo M., Hyrskyluoto A., Parkkila S. Cancer-Associated Carbonic Anhydrases IX and XII: Effect of Growth Factors on Gene Expression in Human Cancer Cell Lines, *J. Cancer Mol.* 5: 73-78, 2010

Tostain J., Li G., Gentil-Perret A., Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur J Cancer.* 2010 Dec; 46(18): 3141-8.

Chien M. H., Ying T. H., Hsieh Y. H., Lin C. H., Shih C. H., Wei L. H., Yang S. F. Tumor-associated carbonic anhydrase XII is linked to the growth of primary oral squamous cell carcinoma and its poor prognosis. *Oral Oncol.* 2012 May;48(5):417-23.

Frenzel A., Hust M., Schirrmann T. Expression of Recombinant Antibodies *Front Immunol.* 2013; 4: 217.

Mellstedt H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc).* 2003;39 Suppl C:1-16.

Chomczynski, P. Sacchi. N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162:156-159.

Boom R., Sol C. J., Salimans M. M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen P. M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503.

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) duomenų bazės: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Pleckaityte M., Zvirbliene A., Sezaite I., Gedvilaite A. Production in yeast of pseudotype virus-like particles harboring functionally active antibody fragments neutralizing the cytolytic activity of vaginolysin. *Microb Cell Fact.* 2011 Dec 15;10:109.

Slibinskas R., Samuel D., Gedvilaite A., Staniulis J., Sasnauskas K. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces*

cerevisiae. J Biotechnol. 2004 Jan 22;107(2):115-24.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.

Khalifah RG. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. J Biol Chem (1971) 246(8):2561-73.

Išradimo apibrėžtis

1. Išskirtas antikūnas arba antikūno fragmentas, kuris specifiškai suriša karboanhidrazę XII, apimantis:

a) sunkiosios grandinės kintamąją sritį CDR1, apimančią SEQ ID Nr. 1, sunkiosios grandinės kintamąją sritį CDR2, apimančią SEQ ID Nr. 2 ir sunkiosios grandinės kintamąją sritį CDR3, apimančią SEQ ID Nr. 3, ir/arba

b) lengvosios grandinės kintamąją sritį CDR1, apimančią SEQ ID Nr. 4, lengvosios grandinės kintamąją sritį CDR2, apimančią SEQ ID Nr. 5 ir lengvosios grandinės kintamąją sritį CDR3, apimančią SEQ ID Nr. 6.

2. Išskirtas antikūnas arba antikūno fragmentas, kuris apima sunkiosios grandinės kintamąją sritį, apimančią aminorūgščių seką SEQ ID Nr. 8 ir lengvosios grandinės kintamąją sritį, apimančią aminorūgščių seką SEQ ID Nr. 9.

3. Antikūnas pagal 1 arba 2 punktą, kuris yra monokloninis antikūnas.

4. Antikūno fragmentas pagal 1 arba 2 punktą, kuris yra viengrandis antikūno fragmentas (scFv).

5. Antikūnas arba antikūno fragmentas pagal 1 arba 2 punktą, kuris atpažįsta karboanhidrazę XII žmogaus ląstelėse.

6. Antikūnas arba antikūno fragmentas pagal 1 arba 2 punktą, kuris neutralizuoja karboanhidrazės XII fermentinį aktyvumą.

7. Antikūnas arba antikūno fragmentas pagal 1 arba 2 punktą, kuriame bent viena aminorūgštis yra konservatyviai pakeista kita panašaus poliariškumo aminorūgštimi bet kurioje iš aminorūgščių sekų SEQ ID Nr. 1 – 6 arba SEQ ID Nr. 8 ir

9.

8. Antikūnas arba antikūno fragmentas pagal 7 punktą, kuris atpažįsta karboanhidrazės XII aminorūgščių seką nuo 27-valino iki 130-glicino (SEQ ID NO: 7) arba panašią aminorūgščių seką, kuri yra bent 95 % identiška sekai SEQ ID NO: 7.

9. Antikūno arba antikūno fragmento pagal bet kurį vieną iš ankstesnių punktų konjugatas.

10. Išskirta nukleorūgšties molekulė, koduojanti aminorūgščių seką bet kurio iš antikūnų ir antikūnų fragmentų pagal bet kurį iš ankstesnių punktų.

11. Raiškos vektorius, apimantis nukleorūgšties molekulę pagal 10 punktą.

12. Rekombinantinė ląstelė šeimininkė, apimanti raiškos vektorių pagal 11 punktą.

13. Kompozicija, apimanti antikūną arba antikūno fragmentą pagal bet kurį iš 1-9 punktų, nukleorūgšties molekulę, koduojančią antikūną arba antikūno fragmentą, raiškos vektorių, apimantį nukleorūgšties molekulę ir ląstelę šeimininkę apimančią raiškos vektorių, skirta naudoti vėžio diagnostikai.

14. Antikūnas arba antikūno fragmentas pagal bet kurį iš 1-9 punktų, skirtas naudoti vėžinių ląstelių augimo slopinimui.

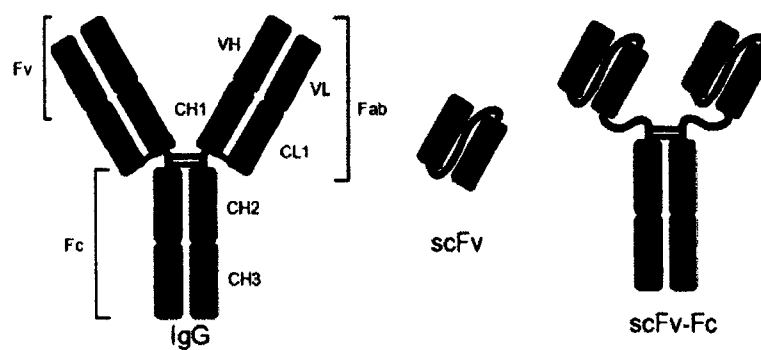


Fig 1

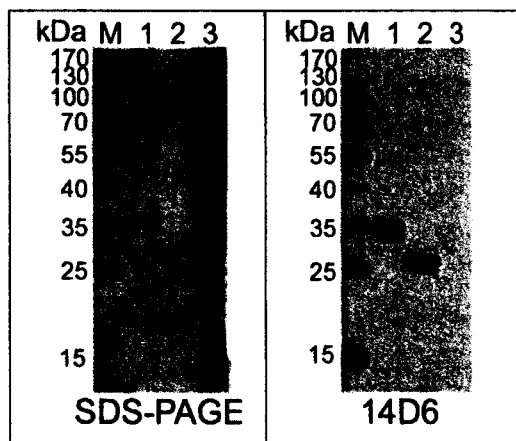


Fig. 2

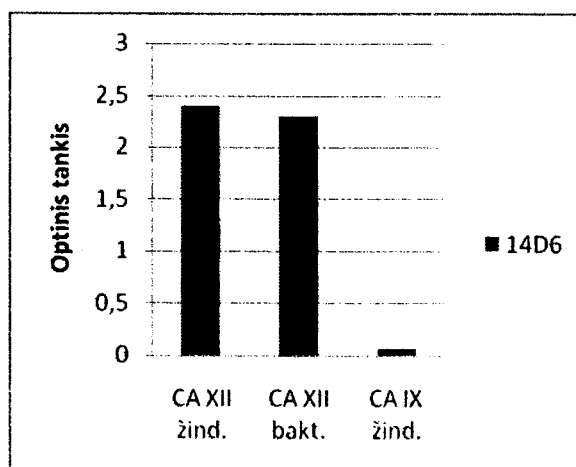


Fig. 3

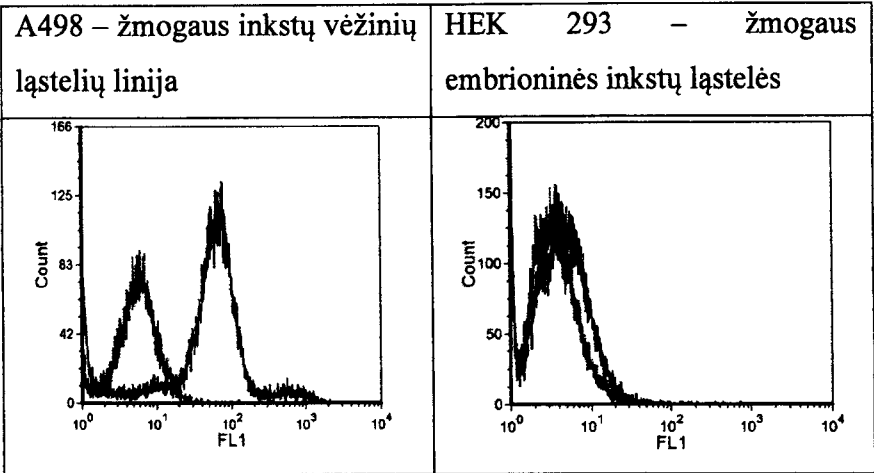


Fig. 4

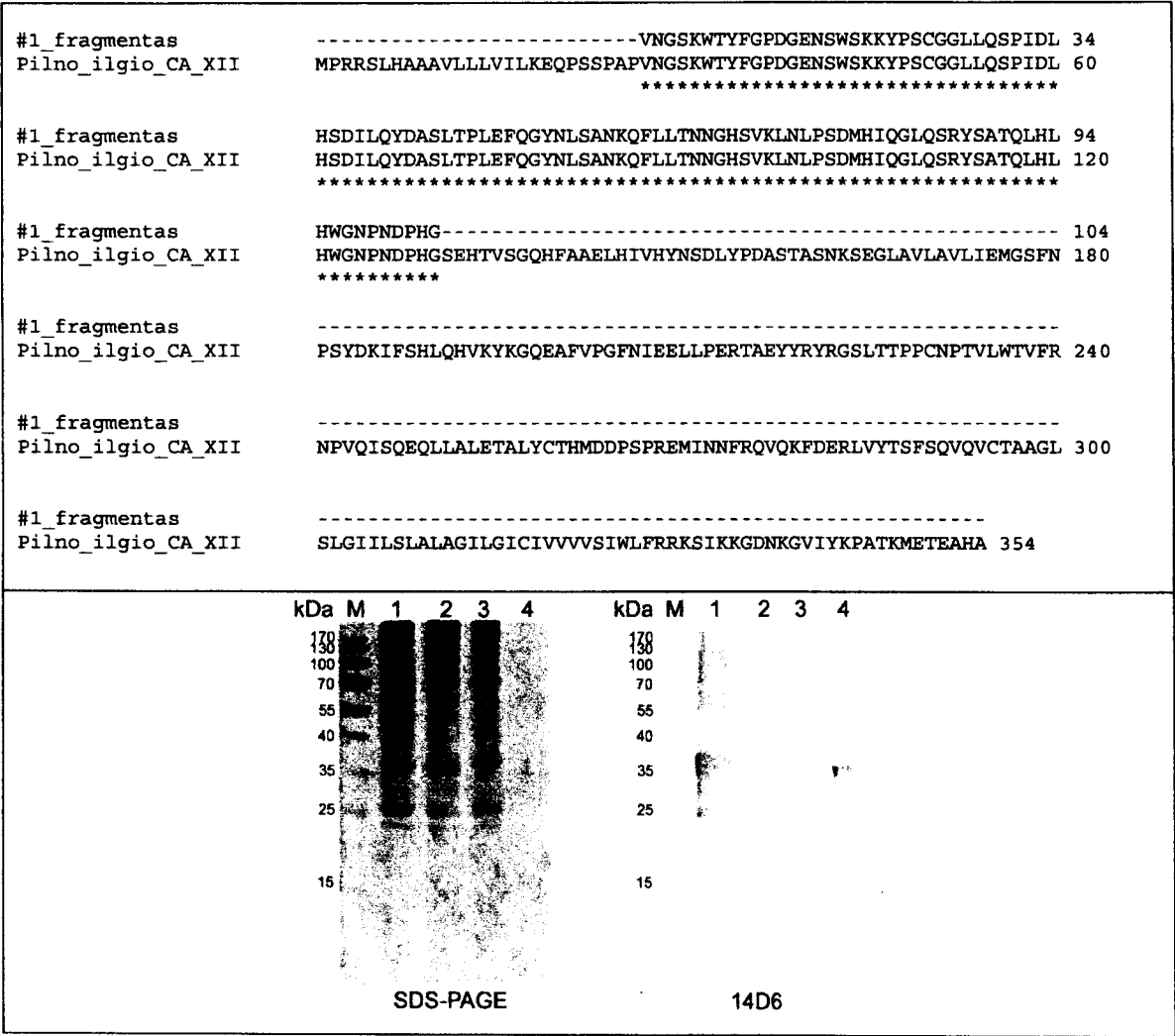


Fig. 5

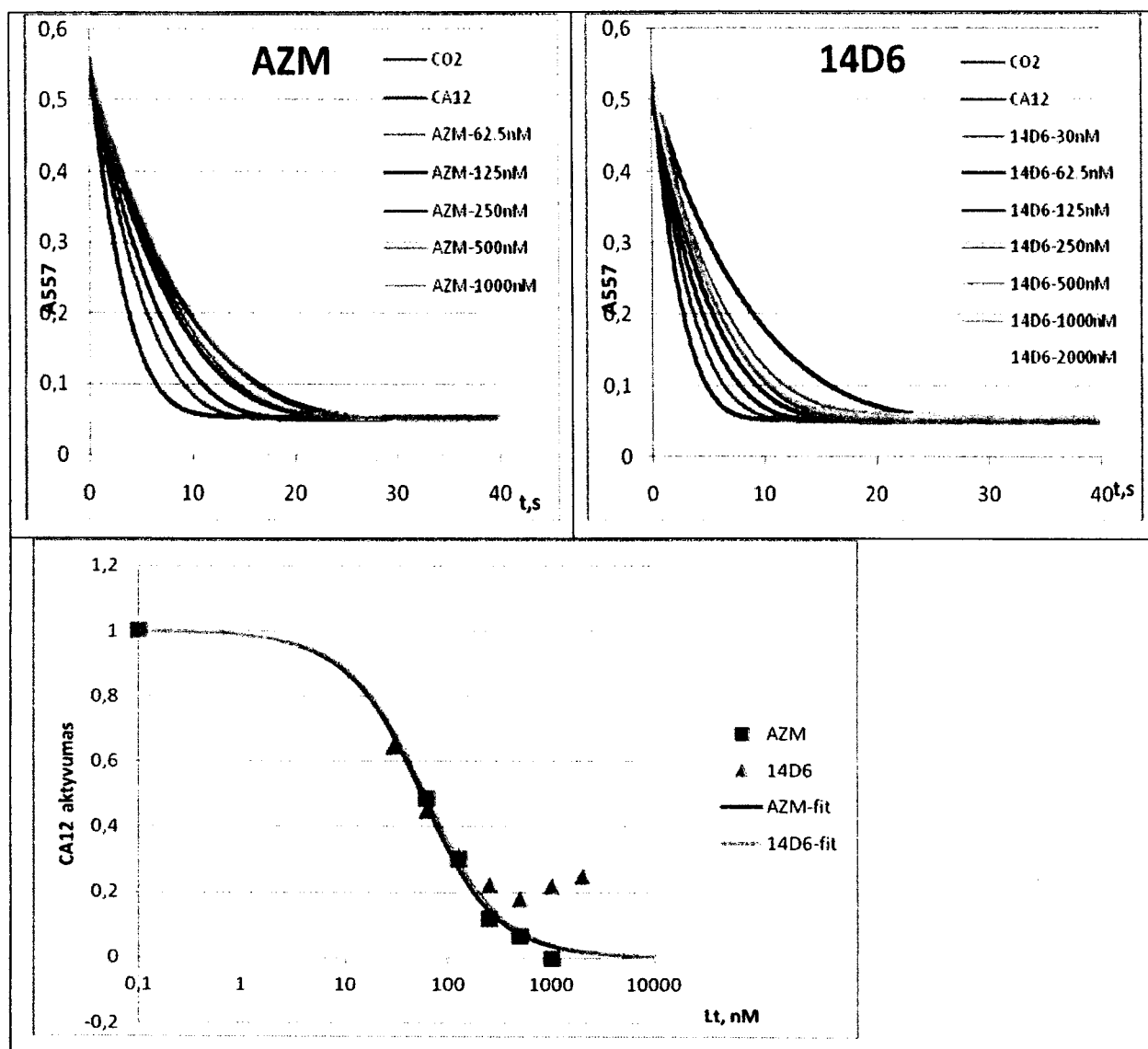


Fig. 6

14D6 VH

caagtacagctggagcagctctgggggaggettagtgcagcctggaggggtcc
 Q V Q L E Q S G G G L V Q P G G S
 cggaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtgactacggaatggcgtgggtt
 R K L S C A A S G F T F S D Y G M A W V
 cgacaggctccaggggaaggggcctgaatggataacattcataagtaatttggcatataga
 R Q A P G K G P E W I T F I S N L A Y R
 atcttctatgcagacactgtgacgggtcgattcaccgtctctagagagaatgccaagaac
I F Y A D T V T G R F T V S R E N A K N
 accctgtacctggaaatgagcagctctgaggtctgaggacacagccacgtactactgtgta
 T L Y L E M S S L R S E D T A T Y Y C V
 agggctacggaatatgctttggactactgggtcaaggaacctccgtcaccgtctcctca
R A T E Y A L D Y W G Q G T S V T V S S

14D6 VL

gatcatatggttgtgatgacccagactacatcctccctgtct
 D H M V V M T Q T T S S L S
 gcctctctgggagacagagtcaccatcaattgcagggcaagtcaggacattaacaattat
 A S L G D R V T I N C R A S Q D I N N Y
 ttaaactggtatcagcagagaccagatggaactgttaaactcctgatctactacacatca
L N W Y Q Q R P D G T V K L L I Y Y T S
 aaattacactcaggagtcacatcaagggttctctggcagtggtctggaacagattattct
K L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S
 ctcaccattagcaacctggaccaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaat
 L T I S N L D Q E D I A T Y F C Q Q G N
 acgcttccattcacgttcggctcggggaccaagctggagatcaaacgg
T L P F T F G S G T K L E I K R

Fig. 7

scFv-Fc1	SS	VL	(G4S)	VH	Fc
scFv-Fc2	SS	VH	(G4S)	VL	Fc

Fig. 8

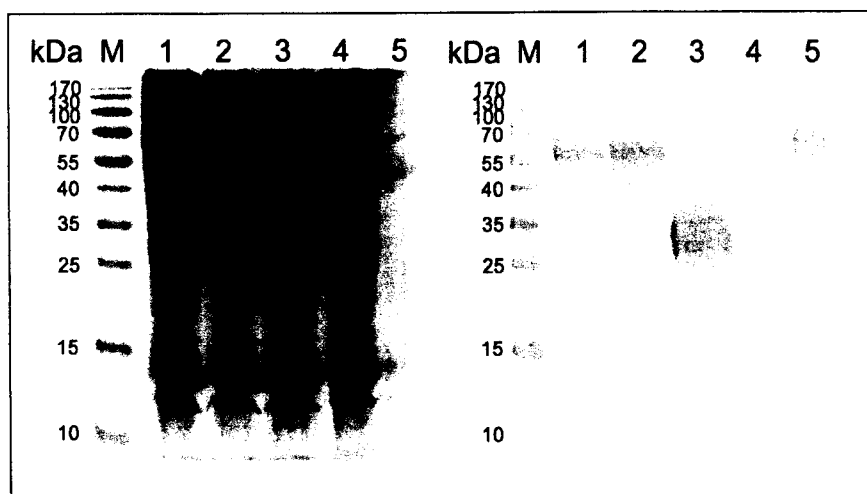


Fig. 9