

(19)



(10) **LT 6389 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **6389**

(51) Int. Cl. (2017.01): **A61K 39/00**
C07K 16/00
A61P 15/00
A61P 31/00

(21) Paraiškos numeris: **2016 100**

(22) Paraiškos padavimo data: **2016-10-03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2017-04-10**

(45) Patent paskelbimo data: **2017-05-10**

(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:

Aurimas BARANAUSKAS, LT
Žilvinas DAPKŪNAS, LT
Gabrielė NEKRAŠĖ, LT
Jonas Henrikas PESLIAKAS, LT
Edita MIŠTINIENĖ, LT
Gitana MICKIENĖ, LT
Gintautas ŽVIRBLIS, LT

(73) Patent savininkas:

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

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

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

(54) Pavadinimas:

Dimerinis antikūno fragmentas, neutralizuojantis vaginolizino citolitinį
aktyvumą

(57) Referatas:

Genetiniais metodais sukonstruoti ir išgryninti nauji dimeriniai antikūno fragmentai prieš vaginoliziną, kurie efektyviai neutralizuoja citolizinį vaginolizino poveikį žmogaus ląstelėms ir gali būti naudojami *Gardnerella vaginalis* sukeltos bakterinės vaginozės profilaktikai ir (arba) gydymui.

Išradimo sritis

Išradimas priskirtinas biotechnologijos ir biofarmacijos sritims bei charakterizuoja naujo rekombinantinio kovalentiškai sujungto dimerinio (tandeminio) antikūno fragmento (di-scFv), neutralizuojančio vaginolizino citotoksinį aktyvumą, gavimą bei savybes.

Išradimo technikos lygis

Genų inžinerijos ir antikūnų humanizacijos metodų tobulėjimas leidžia plačiai panaudoti antikūnus biofarmaciniuose preparatuose. Šiuolaikinė rekombinantinės DNR technologija sudaro galimybes sukonstruoti ir išskirti tikslingai pakeistus (modifikuotus) antikūnus, tinkamus bakterinių toksinų neutralizavimui. Biofarmacinės paskirties antikūnai gali būti gauti skirtingų formų – pilno ilgio chimerinės formos, kitaip vadinami humanizuoti imunoglobulinai, arba antikūnų fragmentai, apimantys tik antikūno regioną, kuris suriša antigeną (Fv). Genai, koduojantys variabilius (kintamus) imunoglobulinų fragmentus arba įvairias tokių fragmentų kombinacijas, gali būti klonuojami iš pelės arba žmogaus B limfocitų ir ekspresuoti bakterijose, mielėse, augalų ir žinduolių ląstelėse. Jau yra gauta visa eilė chimerinių antikūnų sujungus pelės V domeną su 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. Norint padidinti scFv stabilumą ir giminingumą, antikūno Fv fragmentai genų inžinerijos metodais yra sujungiami į nekovalentiškai sujungtus homodimerus, homotrimerus ar homotetramerus (angl. “diabodies, triabodies, tetrabodies”). Siekiant gauti optimalią struktūrą, labai svarbu parinkti tinkamą polipeptidinį jungtuką (linkerį) tarp variabilių antikūno domenų [Todorovska A. et al., Journal of Immunological Methods, vol. 248 (2001), 47–66]. Genų inžinerijos metodais gautų linijinių, kovalentiškai sujungtų scFv (jungiant prie pirmojo monomero C-galo antrojo (ar kelių) monomero N-galą per parinktą jungtuką (linkerį) dimerinė struktūra (tiek homodimerinė, tiek ir heterodimerinė) yra žymiai stabilesnė nei nekovalentinė (būdingą pvz. “diabody”), o afiniškumas (avidiškumas) yra aukštesnis nei monomerinio scFv varianto. Rekombinantiniams antikūnams (ar jų fragmentams) gali būti suteikiamos ir papildomos funkcijos. Rekombinantiniai bispecifiniai antikūnų prototipai buvo sukurti

daugiau nei prieš du dešimtmečius. Tokie antikūnai atpažįsta du skirtingus antigenus, kas leidžia juos plačiau ir efektyviau pritaikyti diagnostikoje arba farmacijoje [Kontermann R. and Brinkmann U., Drug Discovery Today. vol. 20, No. 7, 2015, 838-847].

Viengrandžiai antikūnai arba jų įvairios kombinacijos, turinčios antikūnų specifiškumo sekas (variabilias sritis) ir sujungti su kitokios prigimties sekomis, yra perspektyvus modifikuotų antikūnų su naujomis savybėmis šaltinis [Sandhu, Crit Rev Biotechnol. 1992;12; pp. 437-462].

Toksinas (citolizinas) vaginolizinas (VLY) yra pagrindinis bakterijos *Gardnerella vaginalis* 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 *Streptococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Arcanobacterium*, *Bacillus* ir kitas. Tokie toksinai (dažnai vadinami citolizinais ar hemolizinais) sukelia ląstelės membranos lizę ir atlieka keletą kitų funkcijų, įskaitant citokinų indukciją ir imuninės sistemos moduliaciją. Labai tikėtina, kad šie citoliziniai veikia kaip virulentiškumo faktoriai aukščiau minėtų bakterijų sukeltuose infekciniuose procesuose. [Tweten R. K. Infect. Immun. 2005, 73, pp.6199-6209].

Bakterijos *G.vaginalis* yra žinomos kaip bakterinės vaginozės (BV) sukėlėjai ir yra patvirtinta, kad jų sekretuojamas VLY toksinas 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 dubens uždegimo priežastis. Galima manyti, kad VLY neutralizavimas naudojant antikūnus galėtų būti perspektyvus *G.vaginalis* sukeltų patogeninių efektų gydymo metodas, kas buvo patvirtinta vėlesnėse publikacijose.

Didelio afiniškumo viegrandžių antikūnų (scFv), neutralizuojančių *Bacillus anthracis* toksiną, sukonstravimą aprašė Maynard ir kiti jau anksčiau [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].

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]. Buvo gautos hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus prieš VLY toksiną [Zvirbliene A. et al, 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 A1].

Viengrandžių antikūno fragmentų monomerinė forma, kuri yra specifika VLY citoliziniui ir neutralizuoja jo aktyvumą, buvo sukonstruoti ir aprašyti anksčiau [Pleckaityte M. et al. BMC Biotechnology 2011, 11:100]. Pilno ilgio pelės monokloniniai antikūnai ir monomeriniai scFv, kurie apibūdinti anksčiau skiriasi nuo dimerinių kovalentiškai sujungtų scFv tiek struktūriškai, tiek ir funkciškai, nors abiem atvejais viengrandžiai antikūno fragmentai yra kilę iš to paties 9B4 hibridomos klonu, kuris aprašytas anksčiau [WO 2010/095917 A1].

Šiuo metu yra nemažas poreikis citotoksinio VLY aktyvumo neutralizavimo alternatyvioms priemonėms, kurios pasižymėtų pakankamu efektyvumu, o jų gavimas būtų paprastas ir ekonomiškai. Problema gali būti išspręsta sukonstruojant VLY surišantį rekombinantinį dimerinį scFv, kuris galėtų atpažinti natyvų vaginoliziną iš *G.vaginalis* ir efektyviai neutralizuotų jo sukiamą ląstelių lizę.

Išradimo esmė

Pateikiamo išradimo tikslas - gauti naują viengrandžio rekombinantinio antikūno dimerinį scFv fragmentą, gebantį neutralizuoti VLY (vaginolizino) citolitinį aktyvumą.

Šis išradimas pateikia rekombinantinio dimerinio scFv struktūrą gautą, naudojant dvi kovalentiškai sujungtas monomerinio scFv molekules per lanksčią linkerinę (jungtuko) seką sujungiant vienos scFv molekulės C-galą ir kitos molekulės N-galą.

Pagrindinis išradimo objektas yra dimerinis kovalentiškai sujungtas antikūno fragmentas, atpažįstantis aminorūgščių seką SEQ ID Nr.1

MNNTKFYRNAAMLLLAGATIIPQCLAAPAMAAPAAKDSEPTASCAAKKDSL

NNYLWDLQYDKTNILARHGETIDNKFSSDSFNKGDEFVVVEHQKKNITNTTNSLSVT
 SANDDRVYPGALFRADQNLMDNMPSLISANRAPITLSVDLPGFHGGESAVTVQRPT
 KSSVTSAVNGLVSKWNAQYAASHHVAARMQYDSASAQSMSQLKAKFGADFAKIGV
 PLKIDFDAVHKGEKQTQIVNFKQTYTYSVDAPDSPADFFAPCTTPESLKSRGVDSK
 RPPVYVSNVAYGRSMYVKFDTRSKSTDFQAAVEAAIKGVEIKPNTEFHRILQNTSVT
 AVILGGSANGAAKVITGNVDTLKALIQEGANLSTSSPAVPIAYTTSFVKDNEVATLQT
 NSDYVETKVSSYRDGYLTLDHRGAYVARYYYWDEYGTIDGTPYVRSRAWEGNG
 KYRTAHFNTTIQFKGNVHNLRIKLVEKTGLWEPWRTVYDRSDLPLVRQRTIKNWG
 TTLWPRVAETVKND

arba panašias amino rūgščių sekas, kurių identiškumas yra ne mažesnis kaip 95%.

Šio dimerinio antikūno fragmento struktūra atvaizduojama formule

(VL-L4-VH)-SL-(VL-L4-VH) arba (VL-L4-VH)-SL-(VH-L4-VL),

kur VL yra variabilus imunoglobulinų lengvosios grandinės L fragmentas, VH yra variabilus imunoglobulinų sunkiosios grandinės H fragmentas, L4 ir SL yra linkerinės sekos.

Vienu iš išradimo įgyvendinimo atvejų L4 linkerinė seka yra (G₄S)₄ ir SL linkerinė seka yra SGLEA (EAAAK)₄ ALEA (EAAAK)₄ ALEGS; ir dimerinis antikūno fragmentas turi aminorūgščių seką SEQ ID Nr. 2 arba SEQ ID Nr.3 arba į jas panašias sekas, kurių identiškumas yra bent 95%.

Dimerinis antikūno fragmentas pagal pateikiamą išradimą pasižymi vaginolizino biologinio aktyvumo slopinimu arba neutralizacija.

Šio išradimo objektai taip pat yra rekombinantinė DNR molekulė, koduojanti minėtą dimerinį antikūno fragmentą, bei vektorius, apimantis tokią DNR molekulę.

Konkrečiu išradimo įgyvendinimo atveju minėta rekombinantinė DNR molekulė turi DNR seką SEQ ID Nr. 4 arba SEQ ID Nr.5

Svarbus šio išradimo objektas yra preparatas, apimantis minėtą dimerinį antikūno fragmentą, kuris pasižymi vaginolizino biologinio aktyvumo slopinimu arba neutralizacija.

Dar vienas išradimo objektas yra farmacinė kompozicija, apimanti veiklųjį komponentą ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį, skiediklį, ekscipientą ir (arba) pagalbines medžiagas, kurios veiklusis komponentas apima minėto preparato

terapiškai veiksmingą kiekį.

Farmacinė kompozicija skirta naudoti būklių, sukeltų *Gardnerella vaginalis* infekcijos, profilaktikai ir (arba) gydymui. Optimaliai farmacinė kompozicija yra gelio, ovulės arba ploviklio formoje.

Išradimas yra aprašytas žemiau su detalėmis ir lydinčiais paveikslais bei pavyzdžiais.

Trumpas paveikslų aprašymas:

Dimerinių antikūno fragmentų (di-scFv), specifiskų citolizinui VLY gavimas ir savybės yra iliustruoti paveikslais 1-8.

1 pav. pateikia di-scFv genų konstravimo schemą (A) ir (B), kuri iliustruoja rekombinantinės DNR, koduojančios di-scFv antikūno fragmentus, konstravimo proceso eigą. (A) 1 ir 2 – susintetinti VL-L4-VH-SL ir VH-L4-VL-SL genai gauti atitinkamai pUC57 ir pET28a plazmidėse. Pažymėti pradmenys naudojami scFv genų padauginimui ir teigiamų klonų atrankai. Pažymėti restrikcijos endonukleazių, panaudotų klonavimui ir sekų analizei, DNR hidrolizės taikiniai. (B) I ir II – sukonstruoti du genai: (VL-L4-VH)-SL-(VH-L4-VL) ir (VL-L4-VH)-SL-(VL-L4-VH), kurie gauti pUC57 plazmidėje ir perklonuoti į pET28a ekspresijos plazmidę. Pažymėti pradmenys panaudoti scFv genų padauginimui ir teigiamų klonų atrankai. Pažymėti restrikcijos endonukleazių taikiniai, panaudoti klonavimui ir sekų analizei.

2 pav. parodo di-scFv genų PGR produktų analizės agaroziniame gelyje rezultata. Kolonijų PGR atliekamas nuo atsitiktinai pasirinktų kolonijų su I konstrukcija VL-L4-VH-SL-VL-L4-VH (klonai 1 - 10) ir II konstrukcija VL-L4-VH-SL-VH-L4-VL (klonai 11 – 19). M - MassRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher).

3 pav. parodo pUC57-di-scFv plazmidžių analizės restrikcijos endonukleazėmis rezultata. pUC57-di-scFv plazmidžių analizė restrikcijos endonukleazėmis BamHI / HindIII.

I-a konstrukcija iš klonų 1, 3, 4 ir 5 (VL-L4-VH-SL-VL-L4-VH), ir II-a konstrukcija iš klonų 11, 12, 13 ir 14 (VL-L4-VH-SL-VH-L4-VL); M - MassRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher).

4 pav. demonstruoja pET-28a-di-scFv atrinktų klonų plazmidžių analizės restrikcijos endonukleazėmis rezultatus. Testuotos klonų plazmidės: I1-3, I1-5, I3-8 ir

I4-12 VL-L4-VH-SL-VL-L4-VH, ir II11-19, II11-20, II12-22 bei II13-29 VL-L4-VH-SL-VH-L4-VL

Mėginiai gelyje: 1 – nehidrolizuota DNR; 2 – hidrolizuota BamHI; 3 – hidrolizuota NdeI / HindIII; M - MassRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher).

5 pav. pateikiamos analizuotų genų sekos.

6 pav. pateikiami di-scFv raiškos *E. coli* BL21 (DE3) kamiene natrio dodecil-sulfato poliakrilamidinio gelio elektroforetinės (NDS-PAAG) analizės rezultatai. S - baltymų standartas. 0 h - bendras baltymų mėginys prieš indukciją; 1h, 2h ir 3h - baltymų mėginiai 1, 2 ir 3 valandos po indukcijos. T – tirpi ir N – netirpi baltymų frakcijos po 3 val indukcijos.

7 pav. pateikiami di-scFv baltymų gryninimo rezultatai vertinant NDS-PAAG analizė būdu.

1, 2 takeliai – dimerinio anti-VLY di-scFv baltymo histag-(VL-L4-VH)-SL-(VL-L4-VH) variantas atitinkamai prieš dializę ir po jos. 3, 4 takeliai – dimerinio anti-VLY di-scFv baltymo histag-(VL-L4-VH)-SL-(VH-L4-VL) variantas atitinkamai prieš dializę ir po jos. 5, 6 takeliai – monomerinio anti-VLY scFv baltymo histag-VH-L4-VL variantas atitinkamai prieš dializę ir po jos. 7 takelis - kontrolinis baltyminis mėginys iš biomasės be tikslinio baltymo, praėjusios visas renatūravimo ir gryninimo stadijas.

M - Molekulinės masės markeriai (iš apačios 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 ir 250 kDa).

8 pav. demonstruojamas di-scFv baltymų VLY citoliziną neutralizuojantis aktyvumas, įvertintas hemolizės testu. scFv dimerų neutralizuojantis vaginoliziną aktyvumas įvertintas žmogaus eritrocitų hemolizės tyrimu. Teigiama kontrolė yra scFv monomero aktyvumas. Y ašyje parodyta eritrocitų lizės santykinė reikšmė (%). X ašyje parodyta scFv baltymo koncentracija (ng/ml). Eksperimentų metu visuose mėginiuose naudota vienoda vaginolizino (VLY) koncentracija - 3 ng/ml.

Detalus išradimo aprašymas

Rekombinantinio dimerinio scFv fragmento konstravimas buvo pradėtas nuo sintetinių monomerinių scFv genų variantų VL-L4-VH ir VH-L4-VL su paruoštais jungtukais (linkeriais) ir klonavimo pozicijomis (pav. 1 A) įvedant linkerinę (jungtuko L4) seką, koduojančią 20 amino rūgščių (G₄S)₄ tarp domeno VL (variabilios pelių

imunoglobulinų lengvosios grandinės L srities) ir domeno VH (variabilios pelės imunoglobulino sunkiosios grandinės H srities) bei linkerinę (jungtukas SL) seką koduojančią 54 amino rūgštis SGLEA (EAAAK)₄ ALEA (EAAAK)₄ ALEGS tarp dviejų scFv monomerinių fragmentų (pav. 1 B). Nuo susintetintų genų VL-L4-VH-SL ir VH-L4-VL-SL (GeneScript) buvo atlikta polimerazės grandininė reakcija (PGR), įvedant BamHI ir HindIII restrikcijos endonukleazijų atpažinimo sekas atitinkamai 3' ir 5' galuose. PGR fragmentai gryninami GeneJet (ThermoFisher) DNR gryninimo kolonėlėmis, pagal DNR gryninimo iš PGR mišinio protokolą. Išgrynintos DNR koncentracija įvertinama analizuojant elektroforogramą ir palyginant tikslinių DNR juostelių intensyvumą su įneštu į gelį DNR standartu. Galutinės konstrukcijos (VL-L4-VH)-SL-(VH-L4-VL) ir (VL-L4-VH)-SL-(VL-L4-VH) buvo įklonuotos į ekspresijos vektorių pET28a(+) [Merck, Darmstadt, Germany]. Konstrukcijos su di-scFv apima ir (His)₆ inkarinę seką baltymo N-gale. Galutinės plazmidės buvo transformuotos į *E.coli* BL21(DE3) kamieną.

Buvo naudotos tokios genų inžinerijos procedūros:

1) Susintetinti genai VL-L4-VH-SL ir VH-L4-VL-SL (GeneScript).

2) Atlikta polimerazės grandininė reakcija (PGR), sukonstruojant tokios struktūros di-scFv genus: (VL-L4-VH)-SL-(VH-L4-VL) ir (VL-L4-VH)-SL-(VL-L4-VH) ir įvedant BamHI ir HindIII restrikcijos endonukleazijų atpažinimo sekas atitinkamai 3'- ir 5'-galuose. Konstravimui ir analizėms panaudoti tokie pradmenys:

M13-rev: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3';

T7 forw: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3';

T7 rev: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3';

VHVL-fw: 5'-AATGGATCCCAGGTTCAGCTGGAGCAG-3' pabraukta BamHI atpažinimo seka, paryškinta seka yra komplementari VH fragmento 3' galui;

VHVL-rev: 5'-ATAAAGCTTATTACCGTATTTCCAGCTTGGTCC-3' pabraukta HindIII atpažinimo seka, paryškinta seka yra komplementari VL fragmento 5' galui. Šis pradmuo taip pat įveda terminuojantį kodoną TAA geno 3' gale.

VLmega-fw: 5'-ACCCATATGGATATTGTGATGACACAGTCTACATCCC3';

VLVH_fw: 5'-AATGGATCCGATATTGTGATGACACAGTCTACATCCC-3'; pabraukta BamHI atpažinimo seka, paryškinta seka - komplementari VL fragmento 3'

galui.

VLVH-rev: 5'-ATCAAGCTTATTAGGAGGAGACGGTGACTGAGG-3'
pabraukta HindIII atpažinimo seka, paryškinta seka yra komplementari VH fragmento 5' galui. Šis pradmuo taip pat įveda terminuojantį kodoną TAA geno 3' gale.

3) PGR produktai buvo klonuoti į ekspresijos plazmidę ir DNR sekoskaitos būdu nustatyta fragmentų nukleotidų seka. Nustatytos tokios di-scFv genų koduojamos amino rūgščių sekos SEQ ID Nr.2 ir SEQ ID Nr.3:

(VL-L4-VH)-SL-(VL-L4-VH), SEQ ID Nr.2:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMDIVMTQSTSHLSVSLGDRVTIACKASAHIN
NWLAWYQQKPGNAPSLIAGATGLETGVPSRFSGSGSGKDFTLSISSLQTEDVATY
YCQQYWDTPYTFGGGTTKLEIRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLEQSGPGLV
APSESLTITCTVSGFSLNSYGVHWVRQPPGKGLEWVGVMWAGGNTSYNSALMSR
LSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCARARGAMDYWGQGTSTVTVSSSGLEAEA
AAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEGSDIVMTQSTSH
LSVSLGDRVTIACKASAHINNWLAWYQQKPGNAPSLIAGATGLETGVPSRFSGSG
SGKDFTLSISSLQTEDVATYYCQQYWDTPYTFGGGTTKLEIRGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGVQLEQSGPGLVAPSESLTITCTVSGFSLNSYGVHWVRQPPGKGLEWV
GVMWAGGNTSYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCARARGAMD
YWGQGTSTVTVSS

(VL-L4-VH)-SL-(VH-L4-VL), SEQ ID Nr.3:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMDIVMTQSTSHLSVSLGDRVTIACKASAHIN
NWLAWYQQKPGNAPSLIAGATGLETGVPSRFSGSGSGKDFTLSISSLQTEDVATY
YCQQYWDTPYTFGGGTTKLEIRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLEQSGPGLV
APSESLTITCTVSGFSLNSYGVHWVRQPPGKGLEWVGVMWAGGNTSYNSALMSR
LSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCARARGAMDYWGQGTSTVTVSSSGLEAEA
AAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEGSDIVMTQSTSH
GLVAPSESLTITCTVSGFSLNSYGVHWVRQPPGKGLEWVGVMWAGGNTSYNSAL
MSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCARARGAMDYWGQGTSTVTVSSGGG
GGGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSTSHLSVSLGDRVTIACKASAHINNWLAWYQ
QKPGNAPSLIAGATGLETGVPSRFSGSGSGKDFTLSISSLQTEDVATYYCQQYWD
TPYTFGGGTTKLEIR

4) Galutinės plazmidės buvo transformuotos į *E.coli* BL21(DE3) kamieną. Atrinkti ir išanalizuoti klonai buvo kultivuojami LB terpėje ir indukuojami naudojant IPTG. Atlikus mėginių analizę elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis, nustatytas di-scFv baltymo susikaupimas tarpiniuose kūneliuose po indukcijos, kuris migruoja kaip netirpus ~58 kDa dydžio baltymas.

5) Po indukcijos gauti tarpiniai kūneliai su di-scFv baltymu buvo solubilizuoti naudojant chaotropinius agentus. Renatūruotas di-scFv baltymas buvo išgrynintas naudojant metalo chelatinę afininę chromatografiją.

6) Patvirtintas di-scFv baltymo anti-citolitinis aktyvumas paveikus žmogaus eritrocitus vaginolizinu (hemolizės testas).

Šiuo išradimu buvo nustatyta, kad rekombinantinis antikūno di-scFv fragmentas atpažįsta šią amino rūgščių seką, SEQ ID Nr.1:

MNNTKFYRNAAMLLLAGATIIPQCLAAPAMAAPAAKDSEPTASCAAKKDSL
NNYLWDLQYDKTNILARHGETIDNKFSSDSFNKGDEFVVEHQKNITNTTSNLSVT
SANDDRVYPGALFRADQNLMDNMPSLISANRAPITLSVDLPGFHGGESAVTVQRPT
KSSVTSVAVNGLVSKWNAQYAASHHVAARMQYDSASAQSMSQLKAKFGADFAKIGV
PLKIDFDAVHKGEKQTQIVNFKQTYTYSVDAPDSPADFFAPCTTPESLKSRGVDSK
RPPVYVSNAVYGRSMYVKFDTRSKSTDFQAAVEAAIKGVEIKPNTEFHRILQNTSVT
AVILGGSANGAAKVITGNVDTLKALIQEGANLSTSSPAVPIAYTTSFVKDNEVATLQT
NSDYVETKVSSYRDGYLTLDRGAYVARYYIWDEYGTIDGTPYVRSRAWEGNG
KYRTAHFNTTIQFKGNVHNLRIKLVEKTGLWEPWRTVYDRSDLPLVRQRTIKNWG
TTLWPRVAETVKND

Nurodyta amino rūgščių seka atitinka VLY citolizino, gauto iš *Gardnerella vaginalis* seką, kuri buvo nustatyta ir paskelbta anksčiau (GenBank Nr. EU697812, EU 697811). Skirtingi *Gardnerella vaginalis* kamienai gali ekspresuoti šiek tiek skirtingus VLY variantus, kurie skiriasi nuo sekos SEQ ID Nr.1 viena arba keliomis amino rūgštimis.

Išradimo pavyzdžiai

Žemiau pateikiama informacija apie specifinius pavyzdžius, parodančius koku būdu buvo gautas rekombinantinis antikūno fragmentas di-scFv prieš VLY

citoliziną bei di-scFv savybių nustatymo pavyzdžiai. Ši informacija pateikiama iliustratyvumo tikslais ir neapriboja pateikiamo išradimo apimties.

1 pavyzdys DNR konstrukcijų, koduojančių di-scFv antikūno fragmentus, paruošimas

DNR konstrukcijos bei galutinės raiškos plazmidės yra paruoštos pagal konstravimo schemą pateiktą 1A ir 1B paveiksluose, kuriuose pateiktas fragmentų sujungimo eiliškumas, panaudoti vektoriai ir fermentai.

Susintetintų DNR fragmentų seka VH-L4-VL-SL ir VL-L4-VH-SL (GeneScript) buvo modifikuota PGR metodu, įvedant BamHI ir HindIII restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į fragmento atitinkamai 3'- ir 5'-galus. Panaudoti pradmenys VHVLFw, VHVLFrev, VLVHfw, VLVHrev.

Išgryninti PGR produktai buvo hidrolizuojami BamHI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis ir gauti 715 bp fragmentai gryninami iš agarozinio gelio GeneJet (ThermoFisher) DNR gryninimo kolonėlėmis, naudojant ekstrakcijos iš gelio protokolą.

Plazmidinis vektorius dimerinių antikūnų fragmentų konstravimui yra paruošiamas pUC57-VL-L4-VH-SL plazmidę (GeneScript) hidrolizuojant BamHI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis. Plazmidės DNR galai yra defosforilinami FastAP (ThermoFisher) šarmine fosfataze. Išgrynintas vektorius yra apie 3300 bp ilgio.

Paruošti VL-L4-VH ir VH-L4-VL genai (PGR fragmentai) bei pUC57-VL-L4-VH vektorius yra sumaišomi moliniu santykiu 3:1 ir liguojami naudojant T4 DNR ligazę ((ThermoFisher). Reakcijos mišinys yra transformuojamas į paruoštas kompetentines *E.coli* DH10B bakterijas, atliekant terminį šoką ir po pusvalandžio inkubacijos skystoje LB terpėje, užsėjant ant agarizuotos LB terpės. Užaugusios kolonijos analizuojamos kolonijų PGR būdu naudojant VLmega_fw ir M13_rev pradmenis bei gautus fragmentus analizuojant agaroziniame gelyje (2 pav.). PGR buvo atlikta su atsitiktinai pasirinktų kolonijomis. Gautas tikslinis produktas yra apie 1660 bp ilgio, kiti fragmentai susidaro dėl pasikartojimų sekoje ir galimybės vienam iš pradmenų hibridizuotis su keliomis sekomis įklonuotame gene (apie 800 bp I-os konstrukcijos atveju ir apie 400 bp II-os konstrukcijos atveju). Teigiamų klonų plazmidinė DNR papildomai analizuota restrikcijos endonukleazėmis.

Iš 2 pav. matyti, kad PGR amplifikacija duoda numatyto dydžio konstrukcijų VL-L4-VH-SL-VL-L4-VH ir VL-L4-VH-SL-VH-L4-VL DNR fragmentus.

Išgryninama DNR iš pasirinktų klonų (kolonijų) ir plazmidinė DNR analizuojama ją hidrolizuojant restrikcijos endonukleazių BamHI / HindIII pora, atitinkamai gaunant 720 bp ir 3300 bp ilgių DNR fragmentus, jei DNR seka po klonavimo yra tinkamos struktūros (3 pav.). Iš 3 pav. matyti, kad gauti fragmentų dydžiai atitinka teorinius.

Plazmidinis pET-28a vektorius di-scFv fragmentų perklonavimui yra paruošiamas hidrolizuojant NdeI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis. Plazmidės DNR galai yra defosforilinami naudojant reakcijos mišinyje esančią FastAP šarminę fosfatazę (ThermoFisher). Gauti DNR fragmentai frakcionuojami agaroziniame gelyje ir 5306 bp ilgio fragmentas yra gryninamas iš gelio GeneJet (ThermoFisher) DNR gryninimo kolonėle, pagal ekstrakcijos iš gelio protokolą.

Dimerizuoti scFv genai yra iškerpami iš pasirinktų klonų 1, 3, 4 (I-a konstrukcija), 11, 12 ir 13 (II-a konstrukcija) plazmidžių pUC57 hidrolizuojant NdeI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis. Apytiksliai 1600 bp DNR fragmentai yra išgryninami iš gelio naudojant GeneJet (ThermoFisher) DNR gryninimo kolonėles pagal ekstrakcijos iš gelio protokolą.

Išgryninti di-scFv genai liguojami su paruoštu pET-28a vektoriumi ir transformuojami į paruoštas kompetentes *E.coli* DH10B bakterijas. Kolonijos, turinčios plazmidines DNR su di-scFv konstrukcijas, yra atrenkamos atliekant kolonijų PGR bei tikrinant atrinktų klonų plazmidinės DNR struktūrą restrikcijos endonukleazių hidrolizės testu.

Iš 4 pav. matyti, kad gautų plazmidžių analizė restrikcijos endonukleazėmis duoda reikiamo dydžio DNR fragmentus.

Atrinktų plazmidės pET-28a-di-scFv konstrukcijų sekos yra patvirtinamos DNR sekoskaitos metodu. Genų sekos pateiktos 5 pav.

2 pavyzdys Dimerinių antikūnų fragmentų di-scFv raiška *E.coli*

Dimerinių viengrandžių antikūnų fragmentų raiška *E. coli* buvo patvirtinta atrinkus plazmidines konstrukcijas iš klonų I4-12 ir II11-20 ir atlikus jų transformaciją į ekspresinį *E.coli* BL21 (DE3) kamieną (Novagen, Merck). Kontrolei buvo panaudotas

E.coli BL21 (DE3) kamienas transformuotas pET-28a plazmide be įklonuotų fragmentų. Bakterijos buvo kultivuojamos 37°C temperatūroje pastoviai purtant kolbas ir kultūroms pasiekus 0,6 – 1,2 o.v. (600 nm bangoje) optinį tankį tikslinio baltymo raiška buvo indukuojama pridodant IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside, Sigma) iki galutinės 1 mM koncentracijos. Biomasės mėginiai buvo paimami prieš indukciją (0 val.) ir 1, 2 ir 3 valandas po indukcijos.

Po trijų indukcijos valandų visa biomasė buvo surinkta centrifuguojant. Bakterijos resuspenduojamos ardymo buferyje ir ardomos ultragarsu. Tirpūs baltymai atskiriami nuo netirpios frakcijos centrifuguojant. Baltymų sudėtis tirpioje ir netirpioje frakcijose analizuojama elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (PAAG metodu). Mėginiuose paimtuose prieš ir po indukcijos yra tikrinama bendra baltymų sudėtis suvienodinus biomasės kiekį pagal nustatytą užaugintos kultūros optinį tankį.

Atlikus mėginių analizę elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis, nustatytos tikslinio baltymo sankaupos po indukcijos (stebimas ~58 kDa baltymas). Prieš indukciją ir kontroliniuose mėginiuose, neturinčiuose įklonuoto di-scFv geno, panašaus baltymo kaupimosi nerasta. Analizuojant ultragarsu suardytos biomasės tirpių ir netirpių frakcijų mėginius, nustatyta, kad pagrindinė dalis susintetinto baltymo kaupiasi netirpioje frakcijoje (intarpiniuose kūneliuose).

Iš 6 pav. matyti, kad raiškos eksperimentai duoda numatyto dydžio baltymus bakteriniuose lizatuose po indukcijos.

Darbo metu genų inžinerijos metodais buvo sukonstruoti genai, koduojantys dimerizuotus, dar vadinamus tandeminiais, viengrandžius antikūnų fragmentus su histidininį (6xHis) inkarą koduojančia seka geno pradžioje. Genų sekos buvo patvirtintos sekoskaitos būdu. Rekombinantinių baltymų raiškos *E. coli* bakterijose metu standartinėmis neoptimizuotomis sąlygomis buvo stebimas tikslinių baltymų kaupimasis netirpioje baltymų frakcijoje – intarpiniuose kūneliuose.

3 pavyzdys Dimerinių antikūno fragmentų di-scFv gryninimas

E.coli biomasės su ekspresuotais tiksliniais rekombinantiniais baltymais scFv ir di-scFv buvo resuspenduotos buferiniame tirpale (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, esant 5 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 ir 300 mM 2-merkaptetanolio) santykiu 1:10

(biomasė:buferinis tirpalas) ir suardytos ultragarsu. Kontrolei naudojama *E.coli* biomasė, transformuota pET28a vektoriumi be įklonuoto rekombinantinio geno ir nevykdanti scFv superekspresijos. Homogenizatas centrifuguotas 60 min., 10000×g. Likusios nuosėdos du kartus praplautos 20 ml 20mM Tris-HCl pH7,0 su 1 M NaCl ir 0,1% Tween 80 ir vieną kartą 20 ml 20mM Tris-HCl pH7,0 tarpuose tarp plovimų centrifuguojant 30 min., 10000×g +4°C temperatūroje.

Renatūracija. Nuosėdos, gautos po paskutinio plovimo ir turinčios scFv ir di-scFv baltymus bei kontrolinis mėginys, tirpinami 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 buferiniame tirpale, turinčiame 7 M guanidino hidrochlorido ir pridedama DTT iki galutinės 10 mM koncentracijos. Suspensijos maišomos 2 val. 4°C, centrifuguojamos 30 min. 10304×g ir supernatantai lėtai skiedžiamas 20 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu pH 8,5 iki galutinės 3,5 M guanidino hidrochlorido koncentracijos. Pridedama oksiduoto glutationo iki galutinės 10 mM. Suspensijos maišomos 1 val. 4°C, centrifuguojamos 30 min. 10304×g ir supernatantai lėtai skiedžiami 20 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu pH 8,5 iki galutinės 1,75 M guanidino hidrochlorido koncentracijos. Suspensijos maišomos 1 val. 4°C, centrifuguojamos 30 min. 10304×g ir supernatantai lėtai skiedžiami 20 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu pH 8,5 iki galutinės 0,8 M guanidino hidrochlorido koncentracijos. Suspensijos maišomos per naktį 4°C, centrifuguojamos 30 min. 10304×g. Į supernatantus pridedama NaCl iki galutinės 0,3 M koncentracijos ir koreguojamas pH iki pH 8,0.

Baltymų gryninimas. Baltymų tirpalai užnešami ant 1 ml nikeliu (Ni^{2+}) užkrautu IMAC Sepharose 6 FF sorbentu užpildytų kolonėlių, nupusiausvyrintų 50 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu, pH 8,0, turinčiu 300 mM NaCl ir 10 mM imidazolo. Sorbentai plaunami 10 tūrių lygsvarinimo buferiniu tirpalu ir 5 tūriais analogišku buferiniu tirpalu su 20 mM imidazolo. Eliucija vykdoma 50 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu, pH 8,0, turinčiu 300 mM NaCl ir 500 mM imidazolo. Tikslinį baltymą turinčios frakcijos surenkamos ir apjungiamos. Dializuojamos prieš 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl ir centrifuguojamos 30 min 29000×g 4°C temperatūroje. Baltymai saugomi 4°C.

Apskaičiuota baltymo monomerinio scFv molekulinė masė yra 27,35 kDa, teorinis izoelektrinis taškas pI yra 7,76, dimerinio di-scFv molekulinė masė yra 57,68 kDa ir pI 6,67. Eksperimentiškai nustatyta (pagal NDS-PAAG) monomerinio scFv molekulinė masė yra apie 27 kDa, o dimerinio di-scFv - apie 60 kDa. 7 pav. parodo,

kad išgryninti di-scFv baltymai yra tinkami tolimesniems hemolizės eksperimentams.

4 pavyzdys Dimerinių antikūno fragmentų di-scFv 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) inkubuota 30 min. 20 – 25 °C temperatūroje šiuose reakcijos mišiniuose:

Fosfatinis buferinis tirpalas PBS, pH 6,5 (eritrocitų hemolizės nėra);

Dejonizuotas vanduo (100 % eritrocitų hemolizė);

PBS su 3 ng/ml VLY (100 % eritrocitų hemolizė);

3 ng/ml VLY ir 25 ng/ml scFv antikūno monomero PBS, pH 6,5;

3 ng/ml VLY ir 50 ng/ml scFv antikūno monomero PBS, pH 6,5;

3 ng/ml VLY ir 100 ng/ml scFv antikūno monomero PBS, pH 6,5;

3 ng/ml VLY ir 200 ng/ml scFv antikūno monomero PBS, pH 6,5;

3 ng/ml VLY ir 25 ng/ml scFv antikūno dimero PBS, pH 6,5;

3 ng/ml VLY ir 50 ng/ml scFv antikūno dimero PBS, pH 6,5;

3 ng/ml VLY ir 100 ng/ml scFv antikūno dimero PBS, pH 6,5;

3 ng/ml VLY ir 200 ng/ml scFv antikūno dimero PBS, pH 6,5.

Po inkubacijos eritrocitų suspensija centrifuguota 3 min., 800×g ir pamatuotas tirpalo optinis tankis OD, esant 417 nm bangos ilgiui. Didelės optinio tankio reikšmės (OD>3,0) rodo, kad įvyko eritrocitų hemolizė. Mažos OD reikšmės (OD<0,4) rodo, kad eritrocitai buvo apsaugoti nuo suardymo. Į eritrocitų suspensiją pridėjus 3 ng/ml rekombinantinio VLY, eritrocitai buvo pilnai suardyti (OD~3,0). Kai į mišinį buvo pridėta 200 ng/ml scFv dimero antikūno eritrocitai buvo pilnai apsaugoti nuo hemolizės (8 pav.). Gauti rezultatai rodo, jog tiek rekombinantinis scFv monomeras, tiek rekombinantinis scFv dimeras neutralizavo VLY citolitinį aktyvumą. Rekombinantinis scFv dimeras (di-scFv) pasižymėjo didesniu neutralizuojančiu aktyvumu nei scFv monomeras, nes jo reikėjo mažesnės koncentracijos VLY neutralizacijai.

8 pav. įrodo, kad citoliziną VLY neutralizuojantis aktyvumas auga didinant di-

scFv baltymo koncentraciją, be to di-scFv aktyvumas yra aukštesnis nei monomerinio scFv baltymo.

Tokiu būdu, pateikiamas išradimas parodo, kad sukonstruotas dimerinis scFv atpažįsta VLY ir efektyviai neutralizuoja pastarojo biologinį aktyvumą, t.y. inhibuoja VLY savybę sukelti patogenišką žmogaus eritrocitų hemolizę.

Viengrandžių antikūno fragmentų (scFv), sujungtų į kovalentinę dimerinę struktūrą privalumas prieš monokloninius antikūnus yra tame, kad scFv yra gaunami žymiai paprasčiau ir pigiau (bakterinės biosintezės būdu), be to dimerinis scFv pasižymi aukštu afiniškumu ir turi santykinai nedidelę molekulinę masę, kas apsprendžia efektyvesnį scFv patekimą į infekuotus audinius ir stipresnį terapinį poveikį. Rekombinantinė dimerinė scFv molekulė gali būti naudojama kaip potencialus terapinis agentas gydyti bakterijų *G.vaginalis* sukeltus patogeninius efektus.

Apibendrinant gautus duomenis akivaizdu, kad naujas dimerinis antikūno fragmentas scFv yra specifiskas VLY citolizinui iš *G.vaginalis* bakterijų ir efektyviai neutralizuoja pastarojo citolitinį aktyvumą. Dėl to šis dimerinis antikūno fragmentas scFv gali būti naudojamas terapiniais ir profilaktiniais tikslais gydant patologijas, sukeltas *G.vaginalis* infekcijos, arba išvengiant jų. Gauti dimeriniai antikūno fragmentai (di-scFv) atskleidė privalumus prieš monokloninius antikūnus gaminant scFv paprastesniu ir pigesniu bakterinės biosintezės būdu. Be to maža di-scFv molekulinė masė potencialiai lemia stipresnį terapinį poveikį dėl jos efektyvesnio patekimo į infekuotus audinius.

Pramoninis pritaikymas

Dimerinio scFv baltymo taikymo sritys yra susijusios su jo panaudojimu *G.vaginalis* sukeltos bakterinės vaginozės profilaktika ir gydymu. Farmaciniai preparatai ir medicininės priemonės (geliai, ovulės ar plovikliai), turintys anti-citolitinį aktyvumą, yra tinkami biofarmacinių rekombinantinių antikūnų gamybai ir plačiam profilaktiniam panaudojimui.

Farmacinės kompozicijos sudarytos iš dimerinio scFv preparato kombinacijoje su farmaciškai priimtinais nešikliais, skiedikliais, ekscipientais arba (ir) pagalbinėmis medžiagomis skirtomis bakterinės vaginozės profilaktikai arba (ir) gydymui bei pasekmių, sukeltų *G.vaginalis* infekcijos, šalinimui. Šio išradimo taikymas

apima kai kurias bakterinės vaginozės patologijas, sukeliančias priešlaikinį gimdymą, lemiantį žemą naujagimių svorį, dubens uždegimo ligas, endometritą ir kitas ligas sukeltas *G.vaginalis* infekcijos.

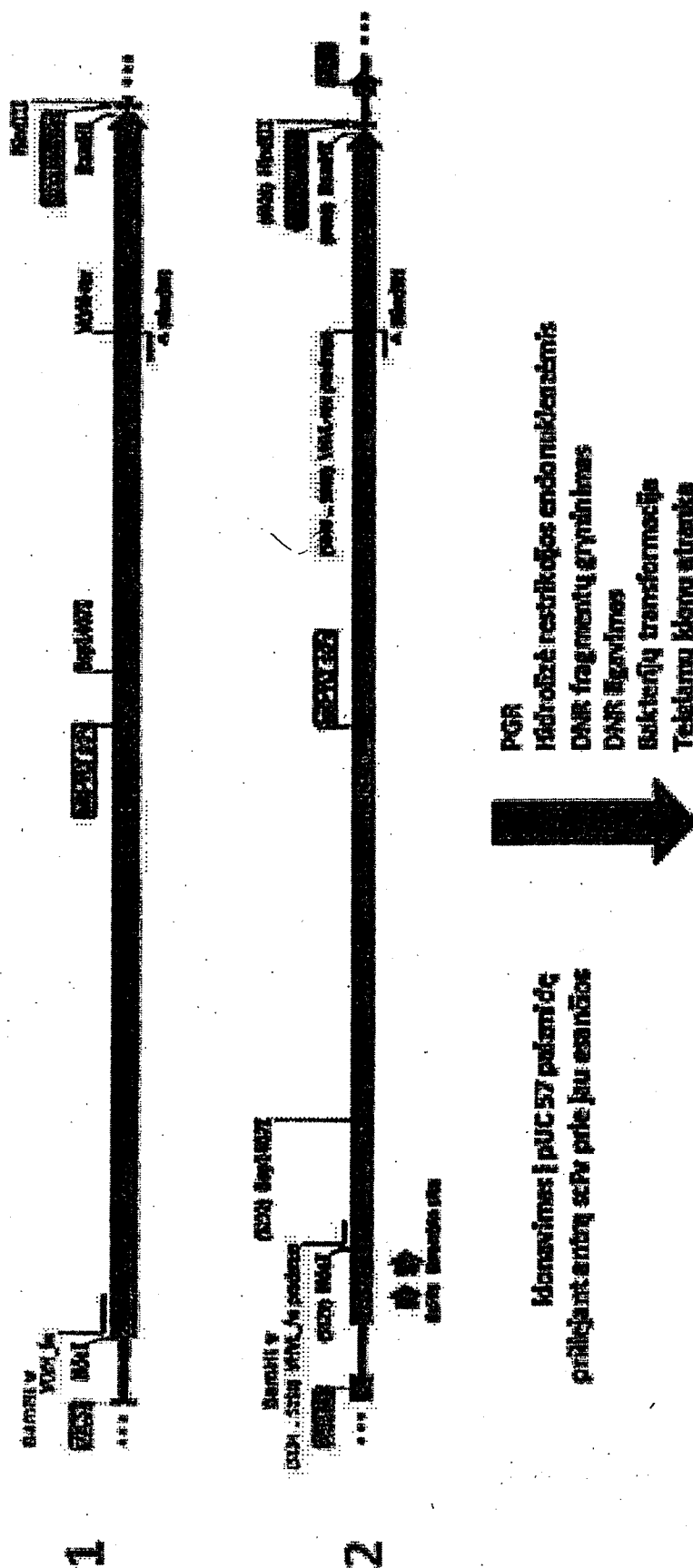
Dar daugiau, panaudojant gautas DNR sekas, koduojančias di-scFv, gali būti sukonstruoti naujos struktūros humanizuoti antikūnai, kurie, tikėtina, galės neutralizuoti VLY citolizino biologinį aktyvumą. Kadangi VLY yra pagrindinis *G.vaginalis* virulentiškumo faktorius, jo neutralizavimas gali būti efektyvus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

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

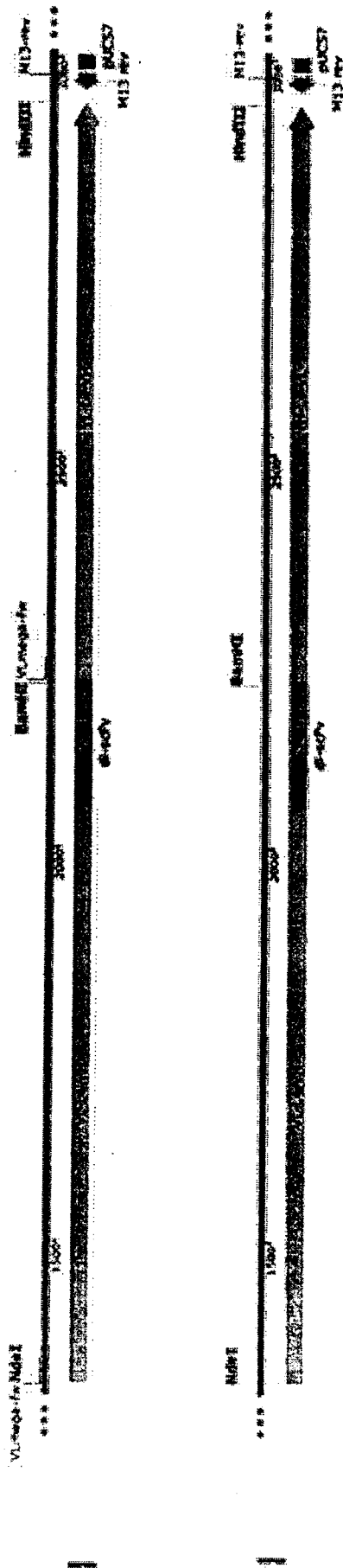
1. Dimerinis kovalentiškai sujungtas antikūno fragmentas, atpažįstantis aminorūgščių seką SEQ ID Nr.1 arba į ją panašią seką, kurios identiškumas yra bent 95%.
2. Dimerinis antikūno fragmentas pagal 1 punktą, kurio struktūra atvaizduojama formule (VL-L4-VH)-SL-(VL-L4-VH) arba (VL-L4-VH)-SL-(VH-L4-VL), kur VL yra variabilus imunoglobulinų lengvosios grandinės L fragmentas, VH yra variabilus imunoglobulinų sunkiosios grandinės H fragmentas, L4 ir SL yra linkerinės sekos.
3. Dimerinis antikūno fragmentas pagal 2 punktą, kur L4 linkerinė seka yra (G₄S)₄ ir SL linkerinė seka yra SGLEA (EAAAK)₄ ALEA (EAAAK)₄ ALEGS.
4. Dimerinis antikūno fragmentas pagal 2 arba 3 punktą, turintis aminorūgščių seką SEQ ID Nr. 2 arba SEQ ID Nr.3, arba į jas panašias sekas, kurių identiškumas yra bent 95%.
5. Dimerinis antikūno fragmentas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, pasižymintis vaginolizino biologinio aktyvumo slopinimu arba neutralizacija.
6. Rekombinantinė DNR molekulė, koduojanti dimerinį antikūno fragmentą pagal bet kurį iš ankstesnių punktų.
7. Rekombinantinė DNR molekulė pagal 6 punktą, turinti DNR seką SEQ ID Nr. 4 arba SEQ ID Nr.5.
8. Vektorius, apimantis DNR molekulę pagal 6 arba 7 punktą.
9. Preparatas, apimantis dimerinį antikūno fragmentą pagal bet kurį iš 1-5 punktų, pasižymintis vaginolizino biologinio aktyvumo slopinimu arba neutralizacija.
10. Farmacinė kompozicija, apimanti veiklųjį komponentą ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį, skiediklį, ekscipientą ir (arba) pagalbines medžiagas, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad veiklusis komponentas apima preparato pagal 9 punktą terapiškai veiksmingą kiekį.

11. Farmacinė kompozicija pagal 10 punktą, skirta naudoti būklių, sukeltų *Gardnerella vaginalis* infekcijos, profilaktikai ir (arba) gydymui.

12. Farmacinė kompozicija pagal 10 arba 11 punktą gelio, ovulės arba ploviklio formoje.



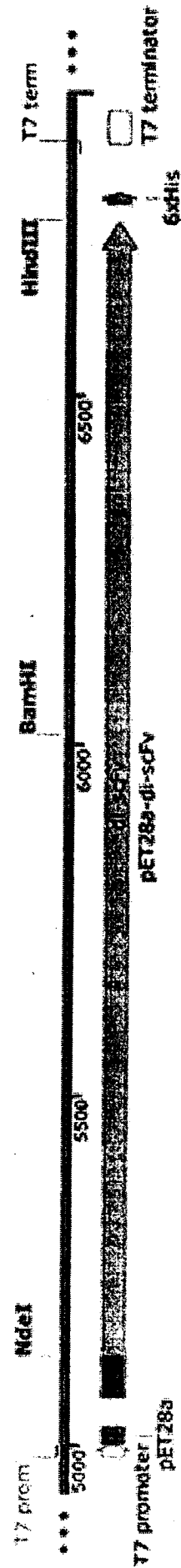
1 A pav.



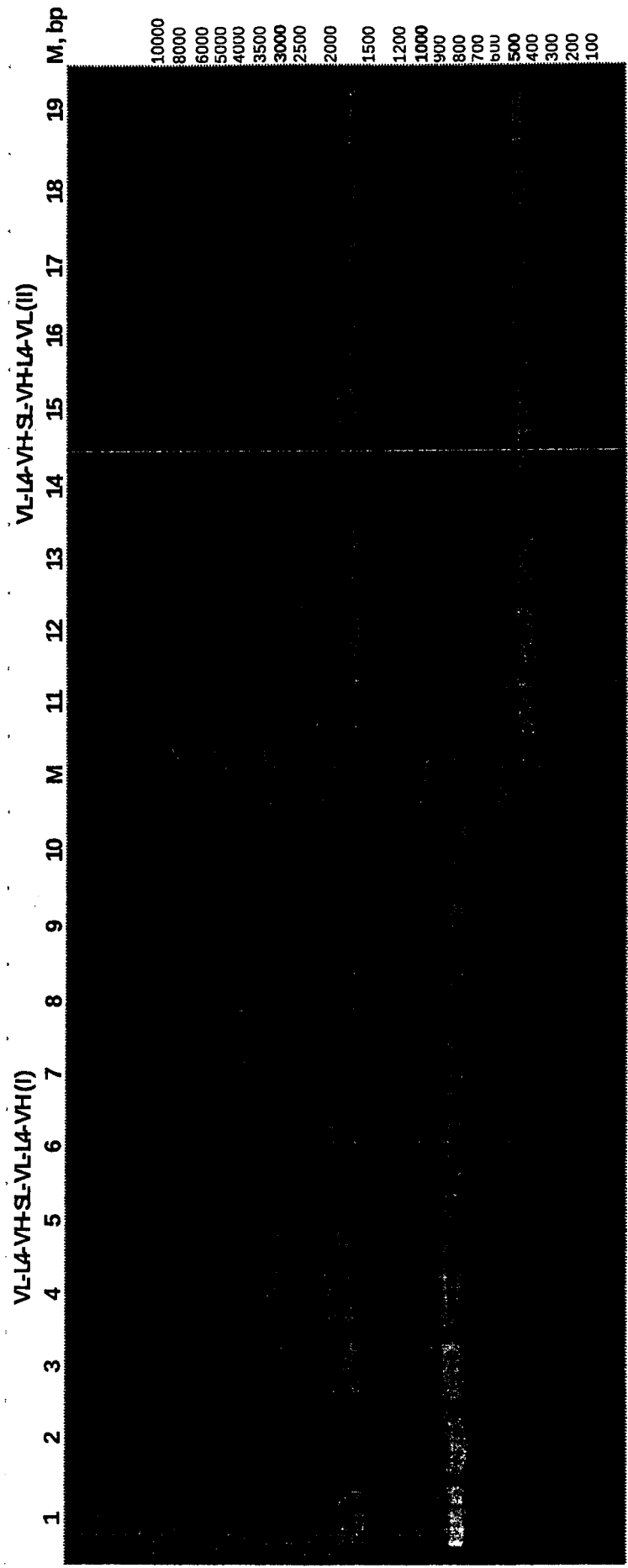
Hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis
 DNK fragmentų gryninimas
 DNK ligavimas
 Bakterių transformacija
 Tęsimų klonų atranka



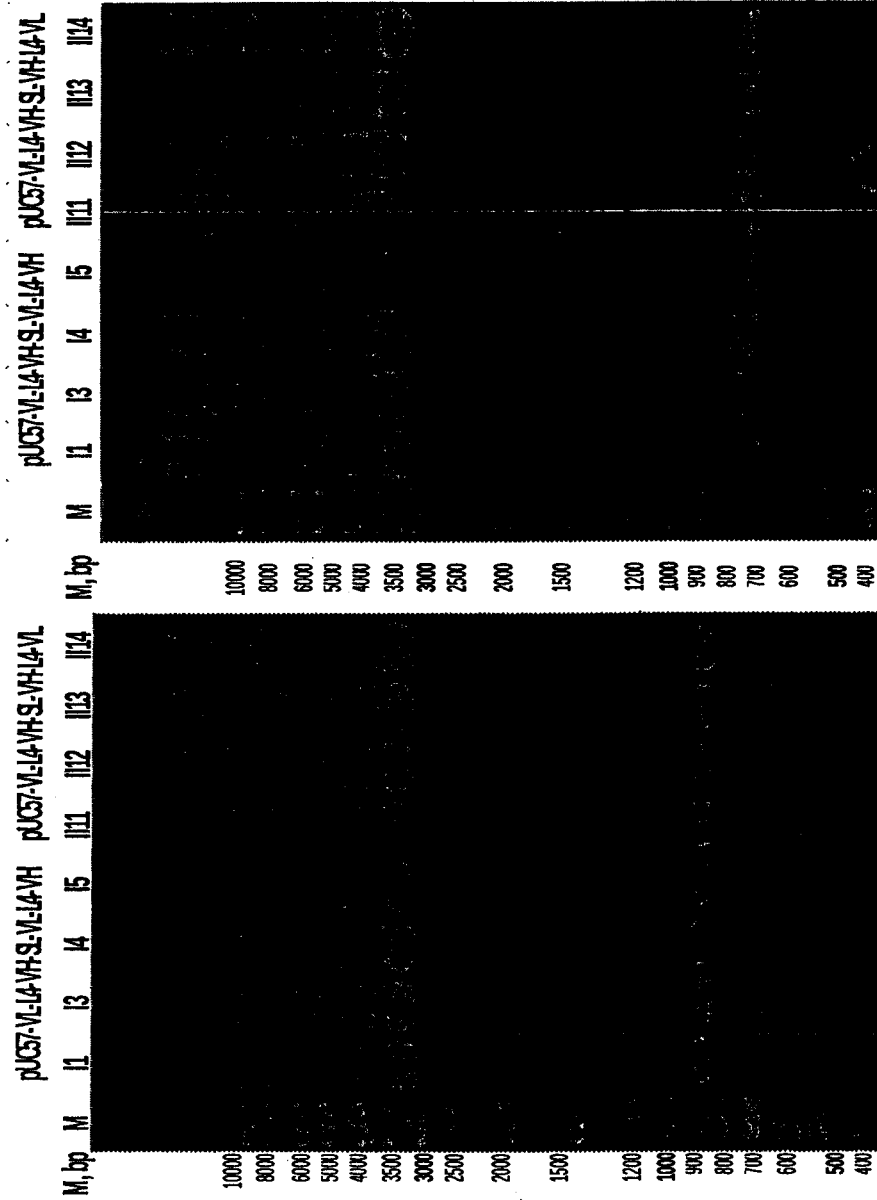
perdionavimas į pET-28a plasmidą
 įvedant histidininį linką 5' geno gale

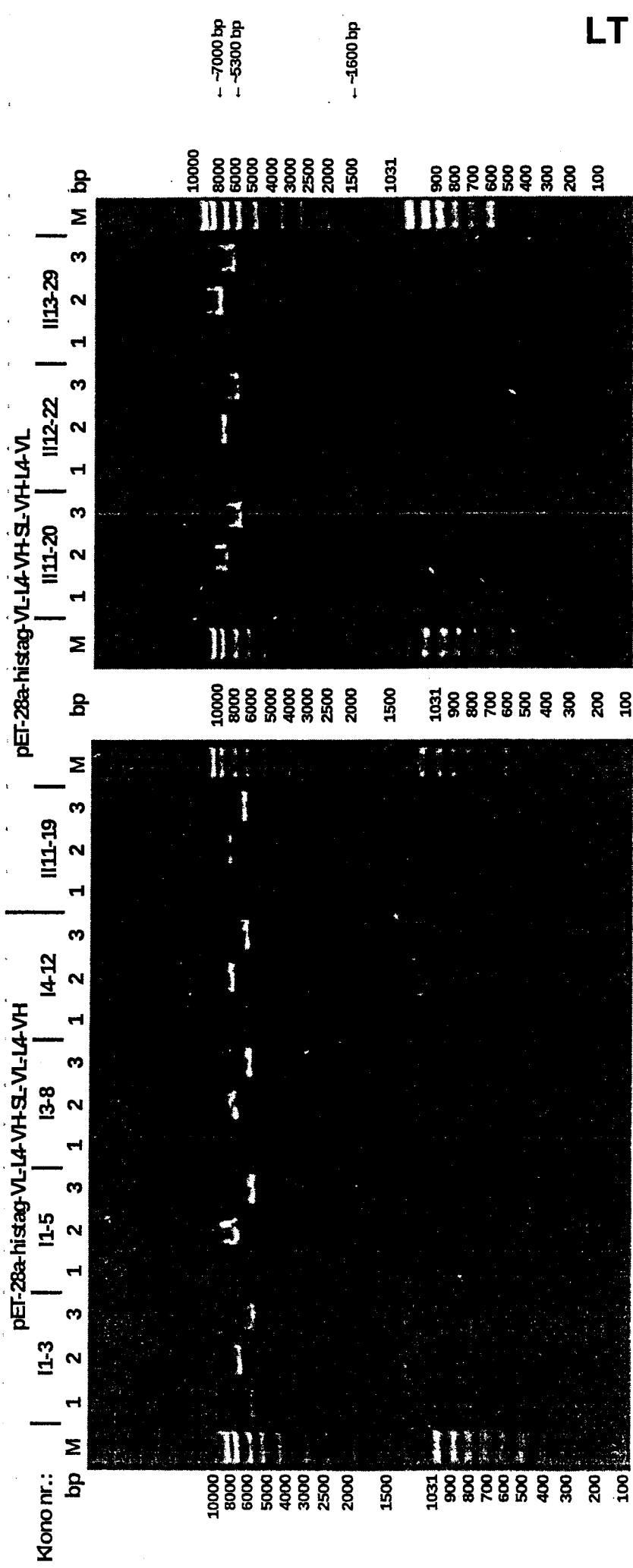


1B pav.



2 pav.





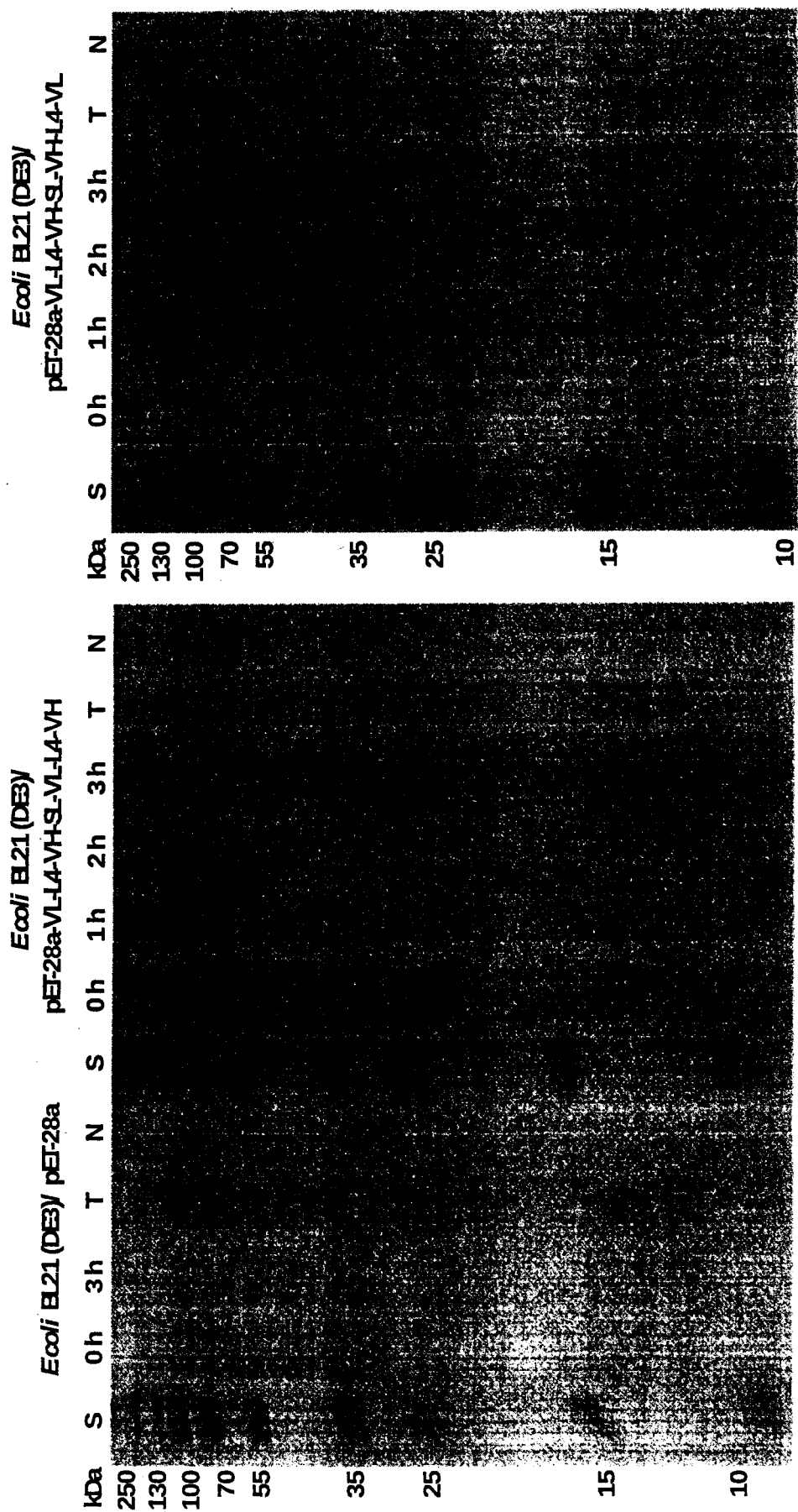
LT 6389 B

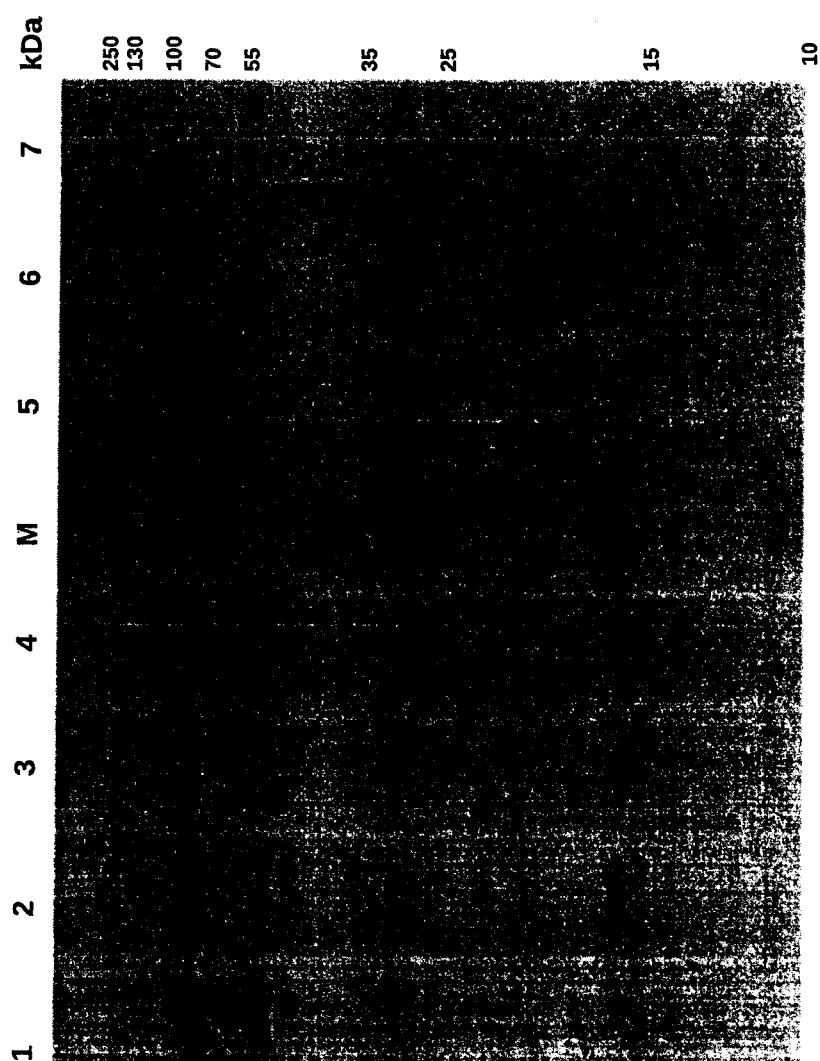
(VL-L4-VH)-SL-(VL-L4-VH), SEQ ID Nr 4:

ATGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCAGCAGCGGCCCTGGTGCCCGCGGCGCCATATGGATATTGTGATGACACAGTCTACATCCCACCTGTCTGTATCT
CTAGGAGACAGAGTCACCATTGTCTGTAAGGCAAGTGCCCAATTAATAATTGGTTAGCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAATGCTCCTAGTCTCTTGATAGCC
GGTGCAACCGGTTTGGAGACTGGGTTCCCTTCAAGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAAGGATTTCACTCAGCATTTCCAGTCTTCCAGACTGAAGATGTTGCT
ACTTATTACTGTCAACAGTATTGGGATACTCCGTATACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAGAGGAGTGGTGGATCTGGTGAGGTGGTCTCTGGTGGA
GGTGGTTCTGGTGAGGTGGCTCCAGGTTCCAGCTGGAGCAGTCCAGACCTGGCCTGGTGCGCCCTCAGAGAGCCTGACCATCACTTGCACTGCTCTCTGGATT
TCACTAAACAGCTATGGTGTACACTGGGTTCCAGCCTCCAGGAAAGGTTCTAGAGTGGTGGCGGTAATGTGGCTGGTGGAAACACAAGTTATAATTCCGCT
CTCATGTCCAGACTGAGCATCAGTAAAGCAACTCAAGAGCCAAAGTTTCTTAAATAATGAACAGTCTGCAAACTGATGATACAGCCATCTACTGTGCCAGA
CGAGGGGGCTATGGACTACTGGGCTCAAGCAACTCAGTACCCTCTCCTCAGGACTTGAGGCTGAAGCAGCAGCTAAAGAGCAGCTAAAGAGCAGCTAAAGAGCA
GCAGCTAAAGAGCAGCAGCTAAAGCTCTCGAGGCTGAAGCAGCAGCTAAAGAGCAGCAGCTAAAGAGCAGCTAAAGAGCAGCTAAAGAGCTCTTGAG
GGATCCGATATTGTGATGACACAGTCTACATCCACTTGTCTGTATCTCTAGGAGACAGAGTCAACCATTTGTTAAGGCAAGTGCCACATTAATAATTGGTTA
GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAATGCTCCTAGTCTCTTGTATAGCCGGTGCACCCGTTTGGAGACTGGGTTCCCTTCAAGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGA
AAGGATTCACTCTCAGCATTTCCAGTCTTCAGACTGAAGATGTTGCTACTTATTACTGTCAACAGTATTGGGATCTCCGTATACGTTCCGAGGGGGACCAAG
CTGGAATAAGAGGAGTGGTGGATCTGGTGAGGTGGTCTGGTGAGGTGGTCCCAGGTTCCAGTGGAGCTGAGGAGCTCCAGGAAAGGGTCTAGAG
GTGGCGCCTCAGAGAGCCTGACCATCACTTGCACTGTCTCTGGATTTCACATAACAGCTATGGTGTACACTGGGTTCCGAGCTCCAGGAAAGGGTCTAGAG
TGGGTGGCGGTAATGTGGCTGGTGGAAACACAAGTTATAATTCCGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGTAAAGCAACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTTAAAA
ATGAACAGTCTGCAAACTGATGATACAGCCATCTACTGTGCCAGAGCGAGGGGGCTATGGACTACTGGGCTCAAGGAACCTCAGTCAACCGTCTCCTCTCTAA

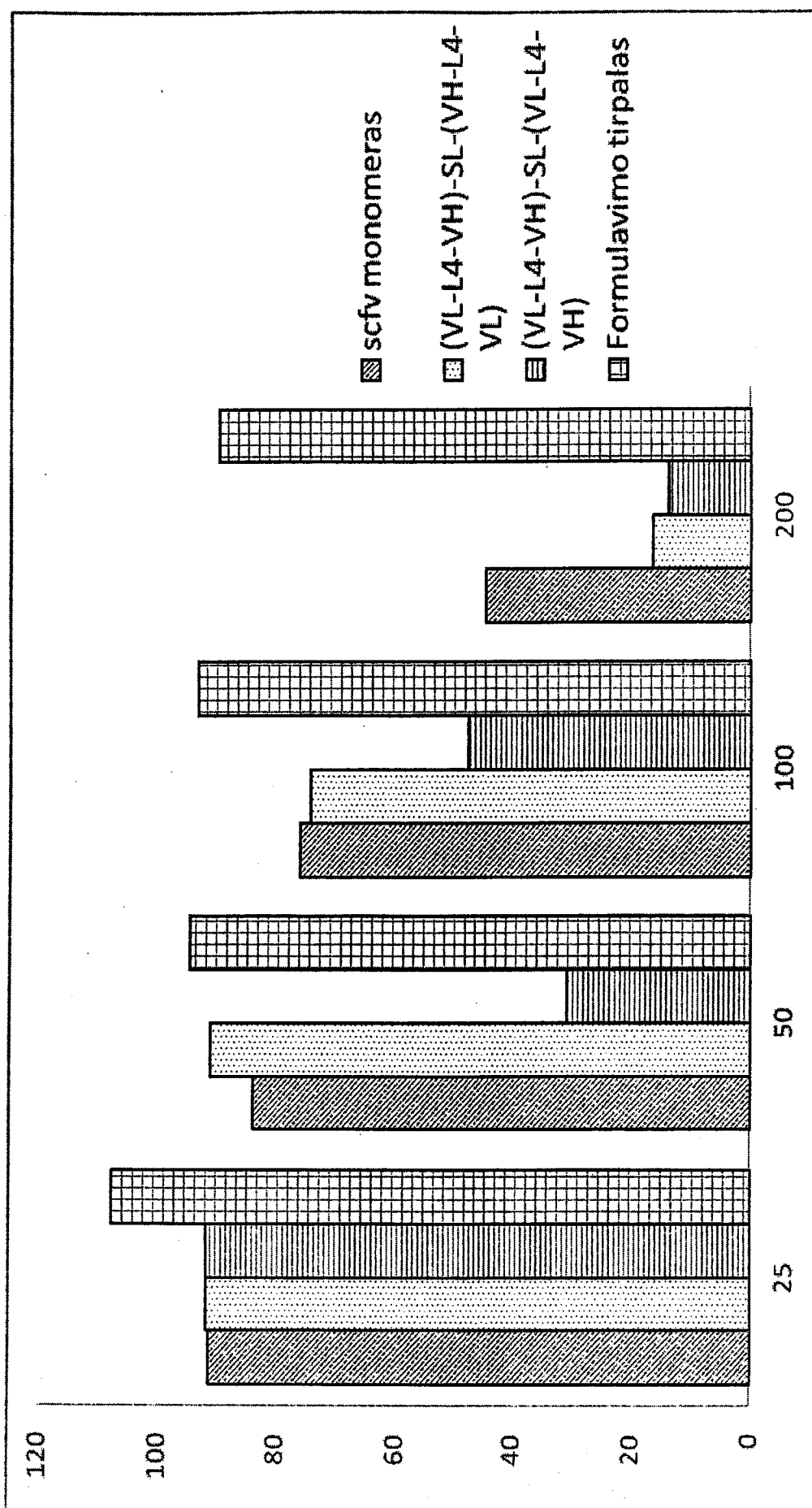
(VL-L4-VH)-SL-(VH-L4-VL), SEQ ID Nr 5:

ATGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCAGCAGCGGCCCTGGTGCCCGCGGCGCCATATGGATATTGTGATGACACAGTCTACATCCCACCTGTCTGTATCT
CTAGGAGACAGAGTCACCATTGTCTGTAAGGCAAGTGCCCAATTAATAATTGGTTAGCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAATGCTCCTAGTCTCTTGATAGCC
GGTGCAACCGGTTTGGAGACTGGGTTCCCTTCAAGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAAGGATTTCACTCAGCATTTCCAGTCTTCCAGACTGAAGATGTTGCT
ACTTATTACTGTCAACAGTATTGGGATACTCCGTATACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAGAGGAGTGGTGGATCTGGTGAGGTGGTCTCTGGTGGA
GGTGGTTCTGGTGAGGTGGCTCCAGGTTCCAGCTGGAGCAGTCCAGACCTGGCCTGGTGCGCCCTCAGAGAGCCTGACCATCACTTGCACTGCTCTCTGGATT
TCACATAACAGCTATGGTGTACACTGGGTTCCAGCCTCCAGGAAAGGTTCTAGAGTGGTGGCGGTAATGTGGCTGGTGGAAACACAAGTTATAATTCCGCT
CTCATGTCCAGACTGAGCATCAGTAAAGCAACTCAAGAGCCAAAGTTTCTTAAATAATGAACAGTCTGCAAACTGATGATACAGCCATCTACTGTGCCAGA
CGAGGGGGCTATGGACTACTGGGCTCAAGCAACTCAGTCAACCGTCTCCTCAGGACTTGAGGCTGAAGCAGCAGCTAAAGAGCAGCTAAAGAGCAGCTAAAGAGCA
GCAGCTAAAGAGCAGCAGCTAAAGCTCTCGAGGCTGAAGCAGCAGCTAAAGAGCAGCAGCTAAAGAGCAGCTAAAGAGCAGCTAAAGAGCTCTTGAG
GGATCCAGGTTCCAGTGGAGCAGTCAAGACCTGGCCTGGTGCGCCCTCAGAGAGCCTGACCATCACTTGCACTGCTCTGGATTTCACATAACAGCTATGGT
GTACACTGGGTTCCAGCCTCCAGGAAAGGTTCTAGAGTGGTGGCGGTAATGTGGCTGGTGGAAACACAAGTTATAATTCCGCTCTCATGTCCAGACTGAGC
ATCAGTAAAGCAACTCCAAGAGCCAAAGTTTCTTAAATAATGAACAGTCTGCAAACTGATGATACAGCCATCTACTGTGCCAGAGCGAGGGGGCTATGGAC
TACTGGGCTCAAGGAACTCAGTCAACCGTCTCCTCAGGAGCGGTGGCTCCGCGGTGGCGGCTCCGAGGCGGTGGCTCCGCTCCGCTGGCTCTGATATTGTG
ATGACACAGTCTACATCCACTTGTCTGTATCTCTAGGAGACAGAGTCAACATTTGTTAAGGCAAGTGCCACATTAATAATTGGTGGCGGCTCTGATATTGTG
AAACAGGAAATGCTCCTAGTCTCTTGTATAGCCGGTGCAACCGGTTTGGAGACTGGGTTCCCTTCAAGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAAAGGATTTCACTCTC
AGCATTTCCAGTCTTCCAGACTGAAGATGTTGCTACTTATTACTGTCAACAGTATTGGGATACTCCGTTATACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAATAACGGTAA





7 pav.



8 pav.