

(11) Patento numeris: **6721** (51) Int. Cl. (2020.01): **C07K 16/00**
G01N 33/00

(21) Paraiškos numeris: **2018 534**

(22) Paraiškos padavimo data: **2018-07-04**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2020-01-27**

(45) Patento paskelbimo data: **2020-03-25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Kęstutis SASNAUSKAS, LT
Aurelija ŽVIRBLIENĖ, LT
Aušra VAITIEKAITĖ, LT
Marija GER, LT
Rasa PETRAITYTĖ-BURNEIKIENĖ, LT
Paulius Lukas TAMOŠIŪNAS, LT
Gintaras Ferdinandas KAUBRYS, LT

(73) Patento savininkas:

Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras "Dvyniai",
LT-03163 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Monokloniniai antikūnai prieš peptidą, reguliuojantį su Alzheimerio liga
siejamo baltymo PSEN 1 sintezę**

(57) Referatas:

Išradimas apibūdina naujus monokloninius antikūnus, specifiskus žmogaus PSEN1 geno koduojamam PSEN1-49 peptidui. Sukurtieji monokloniniai antikūnai gali būti taikomi diagnostiniais tikslais. Išradime aprašomos naujos hibridomos 11D1 ir 2C1, gaminančios monokloninius antikūnus prieš PSEN1 geno 5'-NKD koduojamą 49 aminorūgščių ilgio peptidą PSEN1-49. Detali atpažinimo sekų analizė parodė, kad 11D1 ir 2C1 monokloniniai antikūnai atpažįsta skirtingus PSEN1 sekos fragmentus. Monokloniniai antikūnai gali būti naudojami peptido PSEN1-49 testavimui bei testavimo rinkinių kūrimui.

Išradimo sritis

Šis išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai. Jo esmė - monokloninių antikūnų prieš peptidą, kuris galimai reguliuoja su Alzheimerio liga siejamo baltymo PSEN1 sintezę, sukūrimas.

Technikos lygis

Ilgėjant žmonių gyvenimo trukmei, Alzheimerio liga (AL) tampa viena iš svarbiausių senyvo amžiaus žmonių demencijos priežastimi. Biocheminiai AL mechanizmų tyrimai parodė, kad ligos priežastis yra netirpių amiloidinių agregatų formavimasis, sukeliantis neuronų žūtį. Genetiniai tyrimai parodė, kad jautrumą AL daugiausia lemia keturi genai. Vienas jų (APP) koduoja β -amiloido pirmtako baltymą, kiti koduoja proteazes, kurios skaldo APP pirmtaką ir formuoja β -amiloido polipeptidus. BACE1 proteazė skelia APP baltymą β -taikinyje, o PSEN1 ir PSEN2 genų koduojamos proteazės toliau skaldo APP γ -taikiniuose, suformuodamos 36 - 42 aminorūgščių β -amiloido polipeptidus (De Stopper B., *Physiol. Rev.*, 2010, 50, pp. 465-494; Giri M., Shah A., Upreti B. et al., *Biomed. Rep.*, 2017, 7, pp.105-114). Mechanizmai, lemiantys β -amiloido susidarymą ir jo patogeniškumą dar mažai suprantami, kol kas nėra jokių efektyvesnių AL profilaktikos ar gydymo priemonių. Dabartiniais duomenimis, viena iš lemiamų AL priežasčių yra aukščiau minėtų genų koduojamų baltymų, ypač β -amiloido koncentracijos padidėjimas.

Paskutinių metų tyrimai parodė, kad dauguma eukariotų genų turi didelę transliacijos starto taškų įvairovę nekoduojančioje informacinės RNR (iRNR) 5'-dalyje. Naujausiais duomenimis, apie 50 % genų banke (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) anotuotų žmogaus baltymus koduojančių genų iRNR (informacinės RNR) turi bent po kelis papildomus mažus atvirus skaitymo rėmelius (mASR) iRNR 5'-nekoduojančioje dalyje (5'-NKD), kurie gali būti transliuojami (Slavoff S.A., Mitchell A., Schwaid A.G. et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2013, 9, pp. 59-64; Ma J., Ward C.C., Jungreis I. et al., *Proteome Res.*, 2014, 13, pp. 1757-1765; Wethmar K., Barbosa-Silva A., Andrade-Navarro M.A. et al., *Nucleic Acid Res.*, 2014, 42, pp. D60-D67; Andrews S.J. ir Rothnagel J.A., *Nat. Rev. Genet.*, 2014, 15(3), pp.193-204; Couso JP. ir Patraquim P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2017, 18(9), pp. 575-589). Tokių mASR transliacija įtakoja geno koduojamo pagrindinio baltymo ASR transliaciją ir yra vienas iš neseniai atrastų naujų baltymo sintezės reguliacijos

mechanizmų translacijos lygmenyje (Johnstone T.G., Bazzini A.A. ir Giraldez A.J. EMBO J., 2016, 35(7), pp. 706-723; McGeachy A.M. & Ingolia N.T., EMBO J., 2016, 35(7), pp. 699-700). Įdomu tai, kad dauguma šių mASR baltymo sintezės iniciacijai naudoja ne tik tradicinį AUG tripletą, bet ir alternatyvius tripletus, todėl *in silico* analizuojant genų sekas nėra galimybių nustatyti tokius mASR (Chu Q., Ma J. ir Saghatelian A. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 2015, 50(2), pp. 134-141). Dėl šios priežasties yra būtini eksperimentiniai metodai, patvirtinantys arba paneigiantys iRNR 5'-NKD mASR translaciją ir mASR koduojamų mažų peptidų sintezę. Pademonstruota, kad mASR translacija smarkiai stabdo žemiau esančio pagrindinio ASR translacijos iniciaciją ir pagrindinio baltymo sintezę (Ye Y., Liang Y., Yu O. et al., Hum. Genet., 2015, 134, pp. 605-612). mASR koduojamų mažų peptidų nustatymas būtų tiesioginis tokios reguliacijos patvirtinimas ir leistų sukurti naujus instrumentus, skirtus su AL susijusių baltymų sintezės reguliacijai tirti bei leistų nustatyti naujus taikinius AL terapijai, siekiant slopinti AL išsivystymą sąlygojančių baltymų sintezę. Iki šiol vienintelis tiesioginis mASR koduojamų peptidų nustatymo metodas yra masių spektrometrija (MS). MS metodais buvo pademonstruota, kad žmogaus ląstelėse sintetinama daug mažų peptidų, kuriuos koduoja mASR (Slavoff S.A., Mitchell A.J., Schwaid A.G. et al., Nat. Chem. Biol., 2013, 9, pp. 59-64; Menschaert G., Van Crielinge W., Notelayers T. et al., Mol. Cell. Proteom., 2013, pp.1780- 1790; Ma J., Ward C.C., Jungreis I. et al. J. Proteome Res., 2014, 13, pp. 1757-1765). Pademonstruota, kad kai kurie maži peptidai ne tik dalyvauja pagrindinio baltymo sintezės reguliacijoje, bet turi ir kitų funkcijų *trans* padėtyje. mASR translacija gali keisti pagrindinio baltymo sintezę, taip pat gali sukurti naujas pagrindinio baltymo izoformas, jeigu mASR translacijos fazė sutampa su pagrindinio baltymo ir abu ASR persidengia (Slavoff S.A., Heo J., Budnik B.A. et al., J. Biol. Chem., 2014, 289(16), pp. 10950-10957; Staudt A-C. ir Wenkel S., EMBO Reports, 2011,12(1), pp. 35-42; Magny E.G., Pueyo J.I., Pearl F.M.G. et al., Science, 2013, 341, pp.1116-1120; D'Lima N.G., Ma J., Winkler L. et al., Nature Chem. Biol., 2017, 13(2), pp. 174-180; Cabrera-Quio L-E., Herberg S. ir Pauli A. RNA Biology, 2016, 13 (11), pp.1051-1059; Couso J-P. ir Patraquim P. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2017, 18(9), pp. 575-589).

MS peptidų analizės metodai nėra patogūs masinei biologinių pavyzdžių, tokių kaip kraujo serumai, kraujo plazma ar šlapimas analizei. Tokiai analizei žymiai

tinkamesni, pigesni ir greitesni būtų monokloniniais antikūnais (MAK) paremti imunocheminės analizės metodai, leidžiantys identifikuoti su AL susijusių genų iRNR 5'-NKD mASR koduojamus peptidus. Sukurti imunocheminiai metodai leistų tirti mASR koduojamų peptidų sintezės pokyčius senėjimo procese bei AL patologijos atveju, leistų suprasti kaip ir kodėl kinta AL lemiančių baltymų sintezė, suteiktų naujas galimybes ligos prevencijos priemonių paieškai bei ankstyvai diagnostikai. Šiems tikslams yra reikalingi aukšto specifiškumo monokloniniai antikūnai (MAK), atpažįstantys mus dominančius peptidus.

Trumpas išradimo aprašymas

In silico PSEN1 geno koduojamos iRNR 5'-NKD analizė (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_007318.2) bei žmogaus ląstelių HEK293 lizatų MS analizė parodė, kad žmogaus ląstelės sintetina PSEN1 geno 5'-NKD koduojamą 49 aminorūgščių (ar.) dydžio peptidą, kurio seka yra SEQ ID Nr. 1, pateikta Pav. 1 (A).

Siekiant tyrinėti šio peptido sintezę, jo savybes bei jo reikšmę PSEN1 geno koduojamo baltymo sintezei, buvo sukurti monokloniniai antikūnai, pavadinti 2C1 ir 11D1, atpažįstantys šį peptidą ir reaguojantys su peptidu imunofermentinėse reakcijose.

Brėžinių/paveikslų aprašymas

Pav. 1. (A) PSEN1-49 peptido aminorūgščių (ar.) seka. Šioje sekoje paryškintomis raidėmis pažymėta PSEN-49-19 ar. seka, naudota monokloninių antikūnų gavimui; (B) PSEN1-49-19 ar. peptido seką koduojanti DNR nukleotidų seka. Atskiras peptido aminorūgštis koduojantys nukleotidai paryškinti ir suskirstyti tripletais.

Pav. 2. Gautų monokloninių antikūnų 2C1 imunoblotingo reakcijos su imunizacijai naudotu antigenu - PSEN1-49-19 VPD bei kontrolinės reakcijos. M – baltymų molekulinės masės standartai; 1 - 2C1 antikūnų reakcija su imunizacijai naudotu antigenu PSEN1-49-19 VPD; 2 – 2C1 antikūnų reakcija su VPD neturinčiomis PSEN1-49-19 ar. intarpo; 3 - 2C1 antikūnų reakcija su mielių *S.cerevisiae*, neturinčių antigeną koduojančios plazmidės, lizatu; 4 - 2C1 reakcija su žmogaus ląstelių linijos HEK293 lizatu.

Pav. 3. Gautų monokloninių antikūnų 11D1 imunoblotingo reakcijos su

imunizacijai naudotu antigenu - PSEN1-49-19 VPD bei kontrolinės reakcijos. M – baltymų molekulinės masės standartai; 1 – 11D1 antikūnų reakcija su imunizacijai naudotu antigenu PSEN1-49-19 VPD; 2 – 11D1 antikūnų reakcija su VPD neturinčiomis PSEN1-49-19 ar. intarpo; 3 - 11D1 antikūnų reakcija su mielių *S.cerevisiae*, neturinčių antigeną koduojančios plazmidės, lizatu; 4 - 11D1 reakcija su žmogaus ląstelių linijos HEK293 lizatu.

Pav. 4. Gautų monokloninių antikūnų atpažinimo sekų nustatymas panaudojant persidengiančius peptidus, apimančius visą imunizacijai naudotą PSEN1-49-19 seką (pabraukta ir paryškinta). MAk 11D1 reagavo su (1) ir (2) peptidais, o MAk 2C1 reagavo su (3) peptidu. MAk atpažinimo sekos pabrauktos.

Pav. 5. PSEN1 peptido kiekybinis nustatymas konkurenciniu imunofermentinės analizės metodu, naudojant monokloninį antikūną 2C1. Pateikiamas kalibracinės kreivės pavyzdys. Nežymėtas PSEN-49-19 peptidas (analitė) konkuruoja su žymėtu peptidu dėl sąveikos su antikūnu 2C1. Didėjant analitės koncentracijai, stebimas imunofermentinės reakcijos optinio tankio (OD) mažėjimas.

Lentelė 1. Monokloninių antikūnų subtipai ir tikslios atpažinimo sekos.

MAk pavadinimas	Subtipas	Atpažįstama seka
2C1	IgG2a	SGWSGRNLS
11D1	IgG2b	KQNSGW

Išradimo esmė

Mūsų atlikta su Alzheimerio liga siejamo geno PSEN1 iRNR 5'-NKD sekos *in silico* analizė parodė, kad šio geno iRNR 5'-NKD yra ilga, sudaryta iš 287 nt, joje yra keletas atvirų skaitymo rėmelių, kurie galėtų būti transliuojami, nes turi stiprias transliacijos iniciacijai reikalingas Kozak sekas (Kozak M., Gene, 2002, 299, pp. 1-34). Norint patvirtinti, ar šie *in silico* identifikuoti potencialūs mASR yra transliuojami, buvo atliekama ląstelių HEK293 lizatų MS analizė. MS pagalba, ląstelių lizatuose pavyko rasti peptidą, sudarytą iš 49 ar., koduojamą PSEN1 (GenBank: NM_007318.2) geno iRNR 5'- NKD sekoje rasto mASR. Šio peptido, pavadinto PSEN1-49, ar. seka pateikta Pav.1.

MS peptidų analizės metodai, kurių pagalba identifikavome PSEN1-49

peptidą, nėra patogūs masinei biologinių pavyzdžių, tokių kaip kraujo serumai, kraujo plazma ar šlapimas analizei. Tokiai analizei žymiai patogesni ir greitesni būtų monokloniniais antikūnais (MAK) paremti imunocheminės analizės metodai, leidžiantys identifikuoti tiriamus peptidus. Sukurti imunocheminiai metodai leistų tirti mASR koduojamų peptidų sintezės pokyčius senėjimo procese bei AL patologijos atveju, leistų suprasti kaip ir kodėl kinta AL lemiančių baltymų sintezė, suteiktų naujas galimybes ligos prevencijos priemonių paieškai bei ankstyvai diagnostikai. Šiems tikslams yra reikalingi aukšto specifiškumo monokloniniai antikūnai (MAK), atpažįstantys mus dominančius peptidus. Tokių antikūnų pagalba galima būtų sukurti tiriamojo peptido PSEN1-49 testavimo rinkinį (pavyzdys 4).

Siekiant sukurti antikūnus prieš PSEN1-49 peptidą, buvo paruošti antigenai, tinkami imunizacijai. Tam tikslui buvo pasirinkta PSEN1-49 peptido 19 ar. ilgio hidrofilinėmis savybėmis pasižyminti seka. Šis PSEN1-49 peptido fragmentas buvo pavadintas PSEN1-49-19. Ši 19 ar. ilgio seka PSEN1-49 peptido struktūroje paryškinta ir pabraukta Pav. 1 (A).

PSEN1-49-19 ar. fragmentą koduojanti DNR seka, pateikta Pav. 1 (B), buvo įterpta į poliomos viruso VP1 baltymą koduojančio geno struktūrą tokiu būdu, jog įterptasis peptidas būtų eksponuojamas VP1 baltymo formuojamų virusus primenančių dalelių (VPD) paviršiuje (Žvirblienė A., Gedvilaitė A., Ulrich R. et al., Patent No. US 7,919,314 B2). Mielų raiškos sistemoje buvo gautos ir išgrynintos VPD, savo paviršiuje eksponuojančios PSEN1-49-19 ar. peptidą (PSEN1-49-19-VPD). Paraleliai buvo paruoštas ir kitas imunogenas – sintetinis PSEN1-49-19 ar. peptidas buvo kovalentiškai prijungtas prie moliuskų hemocianino (KLH) ir gautas konjugatas PSEN1-49-19-KLH (Lateef S., Gupta S, Jayathilaka L.P. et al. J.Biomol. Tech., 2007, 18(3), pp.173-176). Šis baltymų konjugatas buvo naudojamas tolesniuose eksperimentuose hibridomų atrankai.

PSEN1-49-19-VPD, savo paviršiuje eksponuojančios PSEN1-49-19 ar. peptidą, buvo panaudotos pelių imunizacijai ir PSEN1-49-19 sekai specifinių hibridomų sukūrimui. Naudojant PSEN1-49-19-KLH konjugatą bei sintetinį PSEN1-49 ar. peptidą buvo atrinktos hibridomos, sekretuojančios monokloninius antikūnus prieš tiriamąjį PSEN1 geno 5'-NKD koduojamą PSEN1-49 ar. peptidą.

Literatūroje yra aprašyta keletas atvejų, kuriuose pademonstruota, kad su AL išsivystymu siejamų genų koduojamų baltymų sintezė yra reguliuojama tų genų iRNR

5'-NKD sekų. BACE1 proteazės, atliekančios pirmąjį β -amiloido pirmtako, APP baltymo skėlimą β -padėtyje, sintezė yra reguliuojama peptido, kurį koduoja BACE1 iRNR 5'-NKD. BACE1 5'-NKD randami net šeši mASR, turintys AUG iniciacijos kodonus. Eksperimentai parodė, kad tik vienas iš jų - ketvirtas pagal eilę nuo iRNR 5'-galo - yra transliuojamas ir koduoja 23 ar. peptidą. Šis peptidas turi AUG iniciacijos kodoną, pasižymintį transliacijai palankia Kozak seka (Kozak M., *Gene*, 2002, 299, pp. 1-34). Šio peptido sintezė patvirtinta eksperimentiškai. Mutavus peptido transliacijos iniciacijos kodoną ATG, BACE1 baltymo sintezė ryškiai padidėja. BACE1 geno 5'-dalies delecija, apimanti rastą peptidą koduojančią 5'-NKD dalį, taip pat ryškiai padidino BACE1 baltymo sintezę. Abiem atvejais iRNR kiekis ląstelėje nepasikeitė, o tai rodo, kad BACE1 sintezės pokyčiai vyko transliacijos lygmenyje ir buvo apspręsti mASR koduojamo mažo peptido sintezės proceso. Šie rezultatai patvirtino mASR koduojamo peptido sintezės reikšmę BACE1 proteazės sintezei (Zhou W. and Song W., *Mol. Cell. Biol.*, 2006, 26(9), pp. 3353-3364).

Su AL siejama ADAM10 geno koduojamos proteazės sintezė taip pat reguliuojama iRNR 5'-NKD. Ši proteazė skaldo APP baltymą ir neleidžia formuotis β A baltymui. Dalies ADAM10 5'-NKD sekos pašalinimas ženkliai padidina ADAM10 proteazės sintezę. Šiame gene iki šiol joks mASR nepatvirtintas, todėl sintezės slopinimas 5'-NKD seka yra aiškinamas keturgrandžių G-struktūrų susidarymu. Keturgrandės G struktūros gali trukdyti ribosomų darbui ir tokiu būdu lėtinti baltymo sintezę (Simone R., Fratta P., Neidle S. et al., *FEBS Letters*, 2015, 589, pp. 1653-1668; Vincent B., *Brain Res. Bull.*, 2016, 126(2), pp.154-169).

Literatūroje nėra jokių duomenų apie PSEN1 geno koduojamo baltymo sintezės reguliaciją iRNR 5'-NKD, taip pat nėra jokių duomenų apie šio geno 5'-NKD esančius mASR ir jų koduojamus peptidus. Mūsų atlikta su AL siejamo geno PSEN1 iRNR 5'-NKD sekos *in silico* analizė bei mūsų atlikta žmogaus ląstelių HEK293 lizatų MS analizė patvirtino, kad PSEN1 geno 5'-NKD koduoja 49 ar. peptidą, mūsų pavadintą PSEN1-49, kurio ar. seka pateikta Pav. 1 (A).

Norint plačiai ir patogiai tyrinėti šio peptido sintezę, paplitimą ir kitas savybes, reikalingi aukšto specifiškumo monokloniniai antikūnai, atpažįstantys šį peptidą ir reaguojantys su juo imunocheminėse reakcijose.

Literatūroje nėra jokių duomenų nei apie šį peptidą, nei šiam peptidui specifinius monokloninius antikūnus (MAK). Šiame išradime buvo gauti nauji

monokloniniai aukšto specifiškumo antikūnai prieš PSEN1 5'-NKD esančio mASR koduojamą PSEN1-49 ar. peptidą. Šių antikūnų gavimui, buvo sukurti antigenai, savo paviršiuje eksponuojantys PSEN1-49 ar. peptido fragmentą PSEN1-49-19 ar. Šiam tikslui, išradimo autoriai, panaudodami genų inžinerijos metodus, PSEN1 geno koduojamą PSEN1-49-19 ar. peptidą įterpė į VPD, sukurtas konstrukcijas (PSEN1-49-19-VPD) panaudojo imunizacijai ir sukūrė 2 hibridomų linijas prieš PSEN1-49-19 ar. peptidą, taip pat ištyrė jų sekretuojamų MAK specifiškumą. Išradimo autorių atlikti tyrimai parodė, kad sukurtieji MAK (11D1 ir 2C1) reaguoja su sintetiniu PSEN1-49 ar. peptidu.

Sukurti monokloniniai antikūnai suteikia galimybę kurti naujus diagnostikos metodus, skirtus stebėti identifikuoto peptido sintezei įvairiose sistemose, tame tarpe įvairiuose organizmo skysčiuose. Tokie stebėjimai leistų susieti peptido sintezės pokyčius su PSEN1 baltymo sinteze bei AL patologija. Susiejus peptido sintezės pokyčius su AL patologija, būtų galima kurti diagnostikos priemones, skirtas ankstyvai AL diagnostikai. Gautų MAK pagrindu būtų galima kurti diagnostikos rinkinius (Pavyzdys 4).

Šiame išradime sukurti MAK yra nauji ir neturi jokių analogų iš kitų šaltinių. PSEN1-49 peptido pilna ar. seka pateikta Pav. 1 (A).

Detalus išradimo aprašymas

Siekiant sukurti MAK prieš PSEN1 5'-NKD koduojamą PSEN1-49 peptidą, pelių imunizacijai buvo sukonstruotos PSEN1-47-19-VPD, savo paviršiuje eksponuojančios PSEN1-49 peptido 19 ar. ilgio, hidrofilinėmis savybėmis pasižymintį fragmentą. Šis fragmentas pavadintas PSEN1-49-19. Šiam tikslui, Pav. 1 pateikta DNR seka, koduojanti PSEN1-49-19 peptidą, buvo klonuota į poliomos viruso VP1 geno pozicijas, užtikrinančias įterptos DNR sekos koduojamo peptido eksponavimą formuojamų VPD paviršiuje (Gedvilaitė A., Frommel C., Sasnauskas K. et al., Virology, 2000, 273(1), pp. 21-35). VPD paviršiuje eksponuojamos sekos yra labai imunogeniškos, todėl yra naudojamos MAK gavimui (Žvirblienė A., Gedvilaitė A., Ulrich R. et al., Patent No. US 7,919,314 B2).

Sukurtos tiriamus peptidus savo paviršiuje eksponuojančios struktūros – virusus primenančios dalelės - PSEN1-49-19-VPD - buvo panaudotos pelių imunizacijai. Paraleliai buvo paruošta KLH baltymo pagrindu suformuota struktūra –

KLH baltymas, konjuguotas su PSEN1-49-19 peptidu – PSEN1-49-19-KLH. Šis konjugatas kartu su sintetiniu PSEN1-49 peptidu buvo naudojami hibridomų atrankai.

Monokloninių antikūnų prieš PSEN1 5'-NKD koduojamą PSEN1-49 peptidą gavimas

1) atliekama imunizacija – PSEN1-49-19-VPD (antigenas) buvo suleidžiamas BALB/c linijos pelėms po oda. Prieš injekciją antigeno tirpalas buvo lygiu tūriu sumaišomas su pilnu Freund'o adjuvantu;

2) atliekama pakartotinė imunizacija – po 4 savaičių pelėms dar kartą buvo suleidžiama tokia pat antigeno dozė po oda, prieš tai antigeno tirpalą sumaišius su nepilnu Freund'o adjuvantu;

3) dar po 4 savaičių buvo suleidžiama tokia pat antigeno dozė be adjuvanto. Imunizacijų metu buvo keletą kartų tikrinama, ar imunizuotų pelių kraujo serume atsirado antikūnų prieš antigeną, atskirai prieš VP1 VPD ir PSEN1-49-19 peptidą. Patikrinimui buvo naudojamas žinomas metodas – imunofermentinė analizė (IFA);

4) praėjus 3 dienoms po trečiosios imunizacijos, buvo atliekama blužnies ląstelių hibridizacija, suliejant jas su vėžinėmis ląstelėmis, būtent, mieloma Sp2/0, suliejimo agentu buvo naudotas polietilenglikolis (PEG) (Sigma, Sent Louis, JAV). Ši ir kitos procedūros buvo atliekamos pagal anksčiau aprašytą procedūrą, naudojamą hibridomų gavimui (Kohler G. ir Milstein C. Nature, 1975, 256, pp. 495-497);

5) gavus hibridinių ląstelių klonus (hibridomas) buvo tikrinamas jų specifiškumas, t.y. nustatoma, ar jie gamina antikūnus prieš PSEN1-49-19 peptidą. Tam buvo naudojamas IFA metodas;

6) gautos hibridomos buvo charakterizuojamos pagal įvairius požymius:

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

7) identifikavus hibridomas, kurios gamina monokloninius antikūnus prieš PSEN1-49-19 fragmentą, o tuo pačiu ir prieš PSEN1-49 peptidą, jos buvo klonuojamos, padauginamos ir užšaldomos tolesniam saugojimui;

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

- IFA bei imunoblotingu, antigenais naudojant PSEN1-49-19-VPD ir PSEN1-49-19-KLH baltymus bei sintetinį PSEN1-49 peptidą;

Atlikus pelių BALB/c imunizacijas PSEN1-49-19-VPD ir suliejus imunizuotų pelių blužnies ląsteles su mielomos ląstelėmis, buvo gautos hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus prieš PSEN1 5'-NKD koduojamą PSEN1-49 peptidą. Ištyrus gautų monokloninių antikūnų savybes, buvo nustatyta, kad jie reaguoja su PSEN1-49 peptidu, PSEN1-49-19-KLH ir PSEN1-49-19-VPD.

Aprašytu būdu buvo gautos ir ištirtos 2 naujos hibridomos, kurios deponuotos Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto (Vilnius) Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje:

1) Hibridoma 2C1, deponavimo numeris PSEN1-2C1, kuri gamina IgG2a subtipo monokloninius antikūnus prieš PSEN1 5'-NKD koduojamą PSEN1-49 peptidą;

2) Hibridoma 11D1, deponavimo numeris PSEN1-11D1, kuri gamina IgG2b subtipo monokloninius antikūnus prieš PSEN1 5'-NKD koduojamą PSEN1-49 peptidą;

Hibridomas 2C1 ir 11D1 apibūdina šie požymiai:

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

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

Ląstelių kultūros požymiai. Hibridomų kultivavimo sąlygos standartinės: augimo terpė - Dubecco modifikuota Eagl'o terpė (DMEM) su 2mM L-glutamino, 200 µg/ml gentamicino ir 10 % embrioninio veršiuko serumo. Hibridomos auginamos stiklo arba plastiko induose, skirtuose ląstelių kultūroms. Ląstelės persėjamos kas 3 - 4 dienos, persėjimo dozė – 50 - 100 tūkstančių ląstelių mililitre terpės. Hibridomos auginamos inkubatoriuje, kurio atmosferoje yra 5 % CO₂, esant 37°C temperatūrai. Ilgalaikiam saugojimui hibridomos užšaldomos embrioniniame serume su 10 % DMSO ir laikomos skystame azote. Užšaldymo sąlygos: 1×10⁶ - 2×10⁶ ląstelių

mililitre, temperatūros režimas – 1 °C per minutę iki -70 °C. Po paros ampulės su ląstelėmis perkeliamos į skystą azotą. Kultūrų atgaivinimui ampulės atšildomos 37 °C temperatūros vandens vonioje. Ląstelių gyvybingumas po atšildymo – 70 - 80 %.

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

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

Produktų charakteristika. Hibridoma 11D1 gamina IgG klasės, IgG2b poklasio monokloninius antikūnus, kurie atpažįsta ar. seką SEQ ID Nr. 2, hibridoma 2C1 gamina IgG klasės, IgG2a poklasio monokloninius antikūnus, kurie atpažįsta ar. seką SEQ ID Nr. 3.

Hibridomų 11D1 ir 2C1 gaminami MAK skiriasi nuo aprašytų analogų – MAK prieš kitus baltymus ir peptidus - pagal tą požymį, kad jie yra specifiškai PSEN1 5'-NKD koduojamam 49 ar. peptidui, kuris funkciškai ir struktūriškai skiriasi nuo kitų peptidų pagal peptido pirminę struktūrą - aminorūgščių seką, pateiktą Pav. 1 (A). Hibridomų 11D1 ir 2C1 gaminami MAK atpažįsta šį peptidą. Jokių analogų, atpažįstančių šios sudėties peptidą aprašyta nėra.

Naujai sukurtų hibridomų ir jų gaminamų MAK prieš PSEN1-49 peptidą savybes iliustruoja informacija, pateikta 1 - 3 pavyzdžiuose ir 1 lentelėje.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Žemiau yra pateikti išradimo gavimo pavyzdžiai. Medžiagos, naudojamos šiuose pavyzdžiuose, gali būti keičiamos ekvivalentiškais medžiagomis, todėl išradimas nėra ribojamas šiais pavyzdžiais.

1 pavyzdys.

Hibridomų, gaminančių monokloninius antikūnus prieš PSEN1 5'-NKD koduojamą PSEN1-49 peptidą, sukūrimas.

BALB/c linijos pelės imunizuojamos antigenu – mielėse susintetintu ir išgrynintu poliomos viruso VPD formuojančiu baltymu VP1, kuris savo paviršiuje eksponuoja PSEN1 5'-NTD koduojamo PSEN1-49 peptido pažymėtą ir pabrauktą ar. seką PSEN1-49-19 (Pav. 1 (A)).

Pelės imunizuojamos, suleidžiant 50 µg antigeno su pilnu Freund'o adjuvantu po oda. Praėjus 4 savaitėms po pirmosios imunizacijos, tuo pat būdu pelės imunizuojamos pakartotinai, suleidžiant 50 µg antigeno su nepilnu Freund'o adjuvantu. Dar po 4 savaičių pelės imunizuojamos, suleidžiant 50 µg antigeno be adjuvantu. Imunizacijų metu tikrinamas antigenui specifiskų antikūnų titras imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Praėjus 3 dienoms po paskutinės imunizacijos, atliekama hibridizacija.

Hibridizacijai naudojamos imunizuotos pelės blužnies ląstelės ir pelių mielomos ląstelės Sp 2/0, neturinčios fermento hipoksantin-guanin-fosforiboziltransferazės, neaugančios selektyvioje hipoksantino-aminopterino-timidino (HAT) terpėje (10^{-4} M hipoksantino, $1,6 \times 10^{-5}$ M timidino, 4×10^{-7} M aminopterino) ir negaminančios imunoglobulinų ar jų grandinių. Prieš hibridizaciją ląstelės turi būti logaritminėje augimo fazėje. Hibridizacija atliekama 2 minutes veikiant ląsteles 50 % polietilenglikolio (PEG-4000) tirpalu Dubecco modifikuotoje Eagl'o terpėje (DMEM) su 10 % dimetilsulfoksido (DMSO). Mielomos ir blužnies ląstelių santykis hibridizacijos metu – 1:5. Po hibridizacijos ląstelės atplaunamos beserumine DMEM terpe, suspenduojamos selektyvioje HAT terpėje ir išsėjamos į plokšteles (po 5×10^5 ląstelių į šulinėlį).

Hibridiniai klonai pasirodė 5 - 10 dieną po hibridizacijos. Testuojant terpę netiesioginės IFA metodu, tikrinama, ar klonai gamina antikūnus prieš antigeną naudoto baltymo eksponuojamą peptidą. Tikrinimui naudojami trys skirtingi antigenai, turintys PSEN1-49 peptido sekos fragmentą PSEN1-49-19: VPD formuojantis VP1 baltymas, savo paviršiuje eksponuojantis PSEN1-49-19 peptidą, KLH-konjuguotas peptidas - PSEN1-49-19-KLH bei cheminiais metodais susintetintas PSEN1-49 peptidas.

Kas 4 - 5 dienos pakeičiama pusė ląstelių augimo terpės. Pirmą kartą HAT terpė keičiama į hipoksantino-timidino (HT) terpę, turinčią 10^{-4} M hipoksantino ir $1,6 \times 10^{-4}$ M timidino. Vėliau HT terpė palaipsniui keičiama į įprastą augimo terpę. Hibridiniai klonai, gaminantys antikūnus prieš tiriamąjį peptidą, t.y. reaguojantys su visais trimis tikrinimui naudojamais antigenais klonuojami ribinio praskiedimo metodu. Klonai pasirodė po 4 - 7 dienų. Jie testuojami netiesioginės IFA metodu. Atrinkti klonai padauginami ir toliau auginami kultūroje arba užšaldomi ir saugomi skystame azote.

Gauti 2 hibridomų klonai, gaminantys monokloninius antikūnus prieš peptidą PSEN1-49-19, reaguojantys su peptidu SHRKQNSGWSGRNLSYEPR. Buvo ištirta jų sąveika su PSEN1-49, nes peptidas PSEN1-49-19 yra peptido PSEN1-49 dalis. Ištirtas gautų hibridomų specifiškumas, nustatyti hibridomų sekretuojamų antikūnų izotipai.

Hibridomos, gaminančios monokloninius antikūnus, atpažįstančius PSEN1-49 peptidą, buvo pavadintos 11D1 ir 2C1. Joms suteikti atitinkami deponavimo numeriai: 11D1 – PSEN1-11D1, 2C1 – PSEN1-2C1.

2 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų, atpažįstančių PSEN1 5'-NKD koduojamą PSEN1-49 peptidą, specifiškumo tyrimas ir izotipų nustatymas.

Hibridomų 11D1 ir 2C1 gaminamų antikūnų specifiškumas nustatomas imunofermentinės analizės (IFA) bei imunoblotingo metodais. Imunoglobulinų izotipai nustatomi IFA metodu, naudojant izotipų nustatymo rinkinį (Sigma, Sent Louis, JAV).

Šiais metodais buvo nustatyta, kad gautieji monokloniniai antikūnai yra IgG izotipo, 2C1 antikūnai yra IgG2a subtipo, o 11D1 antikūnai yra IgG2b subtipo ir reaguoja su sintetiniu PSEN1-49 peptidu bei šio peptido fragmentą PSEN1-49-19 eksponuojančiais baltymais: KLH konjuguotu peptidu PSEN1-49-19-KLH ir VPD eksponuojamu peptidu PSEN1-49-19-VPD. Imunoblotingo rezultatai pateikti Pav. 2 ir Pav. 3. Imunoblotingo metodu nustatyta, kad abu MAK reaguoja su PSEN1-49-19-VPD baltymu, eksponuojančiu PSEN1-49-19 peptidą (SHRKQNSGWSGRNLSYEPR), tačiau nereaguoja su mielių bei HEK293 ląstelių lizatais bei VP1 baltymu, neturinčiu PSEN1-49-19 peptido (Pav. 2 ir Pav. 3). IFA reakcijose šie MAK reagavo su KLH-konjuguotu peptidu PSEN1-49-19-KLH bei su sintetiniu PSEN1-49 peptidu. Tai rodo, kad gautieji MAK yra specifiški PSEN1-49 peptidui. Detalesnė gautų MAK analizė, panaudojant mažesnius sintetinius peptidus, perdengiančius PSEN1-49-19 peptidą, leido identifikuoti tikslesnes sekas, kurias atpažįsta gautieji MAK. 1-oje lentelėje pateikti gautų MAK subtipai bei tikslios atpažinimo sekos. Abu MAK reaguoja su eksperimentuose naudotais antigenais PSEN1-49-19-VPD, PSEN1-49-19-KLH ir PSEN1-49 peptidu. Imunoblotingo eksperimentai rodo, kad abu MAK reaguoja su PSEN1-49-19-VPD baltymu denatūruojančiose sąlygose. Tai patvirtina, kad abu MAK atpažįsta PSEN1-49-19 ar.

seką. Siekiant nustatyti tiksliai gautų MAK atpažinimo sekas, buvo susintetinti persidengiantys peptidai, apimantys visą PSEN1-49-19 seką. Parodyta, kad 2C1 antikūnai reaguoja IFA testuose su SGWSGRNLS peptidu, o 11D1 reaguoja su KQNSGW peptidu (Pav. 4.). Šie rezultatai rodo, kad gauti antikūnai atpažįsta skirtingas PSEN1-49-19 peptido dalis.

3 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų panaudojimas peptido PSEN1-49 sukonzentravimui biologiniuose mėginiuose prieš MS analizę.

Sefarozė su imobilizuotu baltymu A (GE Healthcare, „rProtein A Sepharose® Fast Flow“) penkis kartus plaunama baltymų užnešimo/praplovimo buferiniu tirpalu (3 M NaCl, 1,5 M glicino). Monokloniniai antikūnai atskiedžiami minėtu tirpalu iki 0,2 mg/ml, užnešami ant sorbento ir inkubuojama 2 val. kambario temperatūroje. Paruošiami žinduolių ląstelių lizatai. Apie 10 mln. HEK293 ląstelių plaunama šaltu PBS, užpilama 1 ml RIPA lizavimo tirpalo (150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % natrio deoksicholatas, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8, proteazių slopiklių mišinys (Pierce)). Ląstelės suspenduojamos šiame tirpale ir inkubuojamos 30 min. leduose, tada homogenizuojamos švirkštu su adata. Ląstelių lizatas centrifuguojamas 15 min. esant 20000 g. Supernatantas perkeliamas į švarų mėgintuvėlį ir sumaišomas su paruoštu sorbentu - sefaroze su imobilizuotu baltymu A ir prijungtais antikūnais. Inkubuojama per naktį, +4 °C temperatūroje purtant. Tada mėginiai centrifuguojami 2 min. esant 3000 g, supernatantas pašalinamas, nuosėdos plaunamos 5 kartus PBS, kiekvieną kartą centrifuguojant 2 min. 3000 g greičiu. Toliau vykdoma tikslinių peptidų eliacija užpilant 80 µl eliacijos buferinio tirpalo (7 M urea, 40 mM DTT), inkubuojama 30 min. Kambario temperatūroje purtant. Supernatantas perkeliamas į specialią baltymų koncentravimui skirtą kolonėlę (MWCO 10 kDa) ir centrifuguojamas 15 min. esant 2000 g. Supernatantas surenkamas ir naudojamas tolesniems tyrimams (MS analizei).

4 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų panaudojimas PSEN1-49 peptido koncentracijai nustatyti konkurencinės IFA metodu.

Sukurtas ir optimizuotas konkurencinės IFA metodas, skirtas kiekybiniam PSEN1-49 peptido nustatymui. Analizei naudojamas MAK 2C1, kuris imobilizuojamas

IFA plokštelėje. Nežymėtas PSEN-49 peptidas (analitė) konkuruoja su žymėtu peptidu dėl sąveikos su imobilizuotu antikūnu 2C1. Didėjant analitės koncentracijai, prisijungia mažiau žymėto peptido, todėl stebimas spalvinės fermentinės reakcijos intensyvumo sumažėjimas.

Konkurencinės IFA aprašymas.

Pirmiausia MAK 2C1 imobilizuojamas IFA plokštelėje. Tam tikslui į plokštelės šulinėlius pridedama po 50 µl MAK 2C1 tirpalo (5 µg/ml) fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7,5) ir inkubuojama per naktį +4 – 8 °C temperatūroje. Plokštelė blokuojama Roti-Block (Roth) buferiniu tirpalu, inkubuojant 1 val. kambario temperatūroje. Kalibracinės kreivės paruošimui peptidas PSEN1-49 ištirpinamas PBS ir skiedžiamas PBS/Tween-20 (0,1 %) tirpalu (PBS-T) iki tokių koncentracijų: 10 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,01 µg/ml. Pridėjus peptido, plokštelė inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje, tada atplaunama PBS-T tirpalu ir pridedamas biotinu žymėtas PSEN1-49 peptidas (1 µg/ml) PBST tirpale. Plokštelė inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje, atplaunama PBS-T tirpalu ir tada pridedamas streptavidino-peroksidazės konjugatas (Sigma), atskiestas 1:2000 PBS-T. Plokštelė inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje ir atplaunama PBS-T tirpalu. Pridedamas peroksidazės substratas (TMB, Sigma) ir inkubuojama 10 min., kol išryškėja fermentinė reakcija. Ji sustabdoma, pridedant 1/2 tūrio 3,6 % sieros rūgšties tirpalo. Spektrofotometru Multiscan Go (Thermo Scientific) išmatuojamas optinis tankis (OT), esant 450 nm bangos ilgiui. Braižoma kalibracinė kreivė – OT priklausomybė nuo PSEN1-49 peptido koncentracijos. Esant didesnei PSEN1-49 peptido koncentracijai, OT reikšmės yra mažesnės. Mažiausia konkurencinės IFA metodu stebima PSEN1 peptido koncentracija nusako metodo jautrumą. Jis siekia 30 ng/ml. Kalibracinė kreivė pateikta Pav. 5.

Šio konkurencinio IFA metodo pagrindu gali būti sukurtas rinkinys, skirtas kiekybiniam PSEN1-49 peptido nustatymui. Rinkinio sudėtyje gali būti šie reagentai ir priemonės:

1. IFA plokštelė su imobilizuotu MAK 2C1
2. Blokavimo tirpalas Roti-Block
3. Atplovimo ir mėginių skiedimo tirpalas (PBS-T)
4. TMB substratas

5. Fermentinės reakcijos sustabdymo tirpalas (3,6 % sieros rūgšties tirpalas)
6. Nežymėtas PSEN1-49 peptidas kalibracinei kreivei sudaryti (1 mg/ml)
7. Biotinu žymėtas PSEN1-49 peptidas (1 mg/ml)
8. Streptavidino-peroksidazės konjugatas
9. Rinkinio naudojimo instrukcija.

Gauti duomenys rodo, kad naujai sukurtieji MAk 11D1 ir 2C1 yra specifiški PSEN1 geno koduojamam 49 ar. ilgio peptidui PSEN1-49. Todėl šie MAk galėtų būti taikomi PSEN1-49 peptido nustatymui imunocheminiais metodais, stebint jo sintezę ląstelėse, sekreciją į audinių skysčius. Pavyzdžiui, naudojant šiuos antikūnus galėtų būti atliekamas citologinių mėginių ištyrimas imunohistocheminiu arba IFA metodu. Nustačius, kad mėginiuose yra PSEN1-49, būtų gautas patvirtinimas apie šio peptido vaidmenį PSEN1 baltymo sintezės slopinime.

SEQUENCE LISTING

<110> vilnius university
 <120> Monoclonal antibodies against a peptide regulating the synthesis
 of PSEN1 protein associated with Alzheimer's disease
 <130> V83-54
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Thr Thr Val Arg Val Leu Gly Arg Gly Leu Gly Gln Ala Ala
 1 5 10 15

Pro Gly Ser Ala Val Ser His Arg Lys Gln Asn Ser Gly Trp Ser Gly
 20 25 30

Arg Asn Leu Ser Tyr Glu Pro Arg Arg Gln Arg Gly Gly Gly Glu Ala
 35 40 45

Tyr Thr
 50

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Gly Trp Ser Gly Arg Asn Leu Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

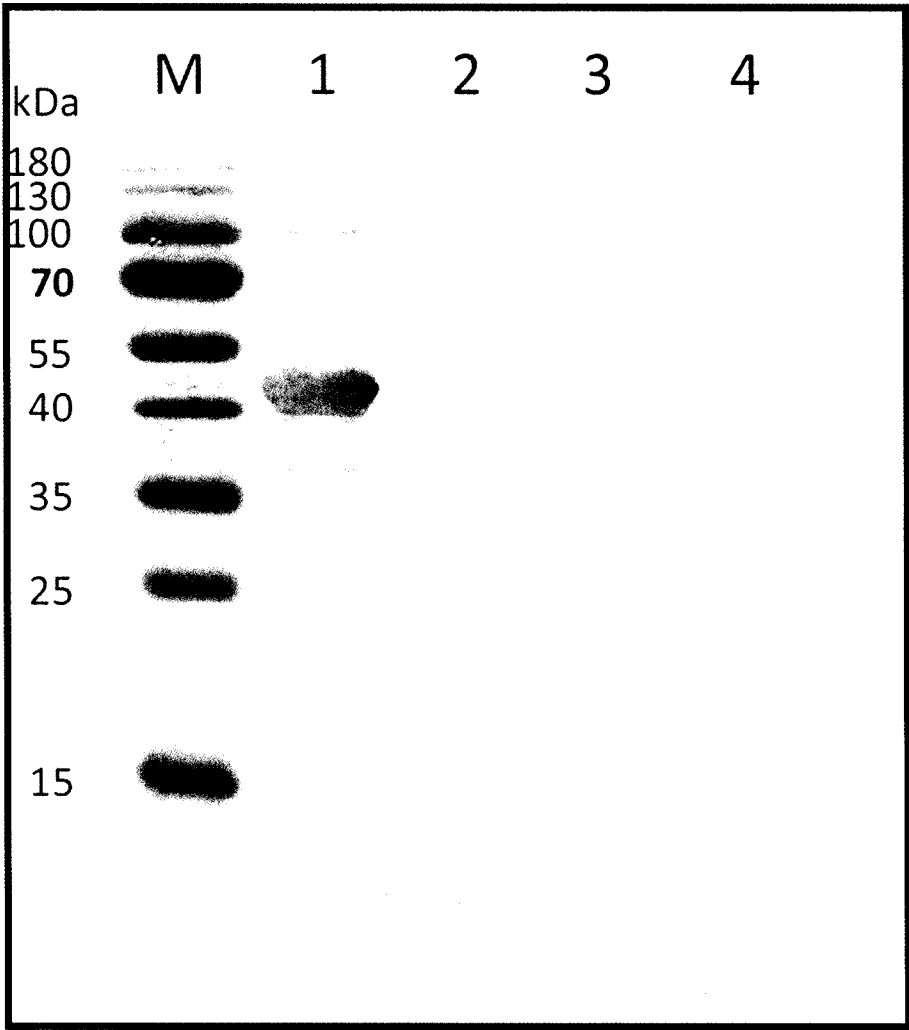
Lys Gln Asn Ser Gly Trp
 1 5

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

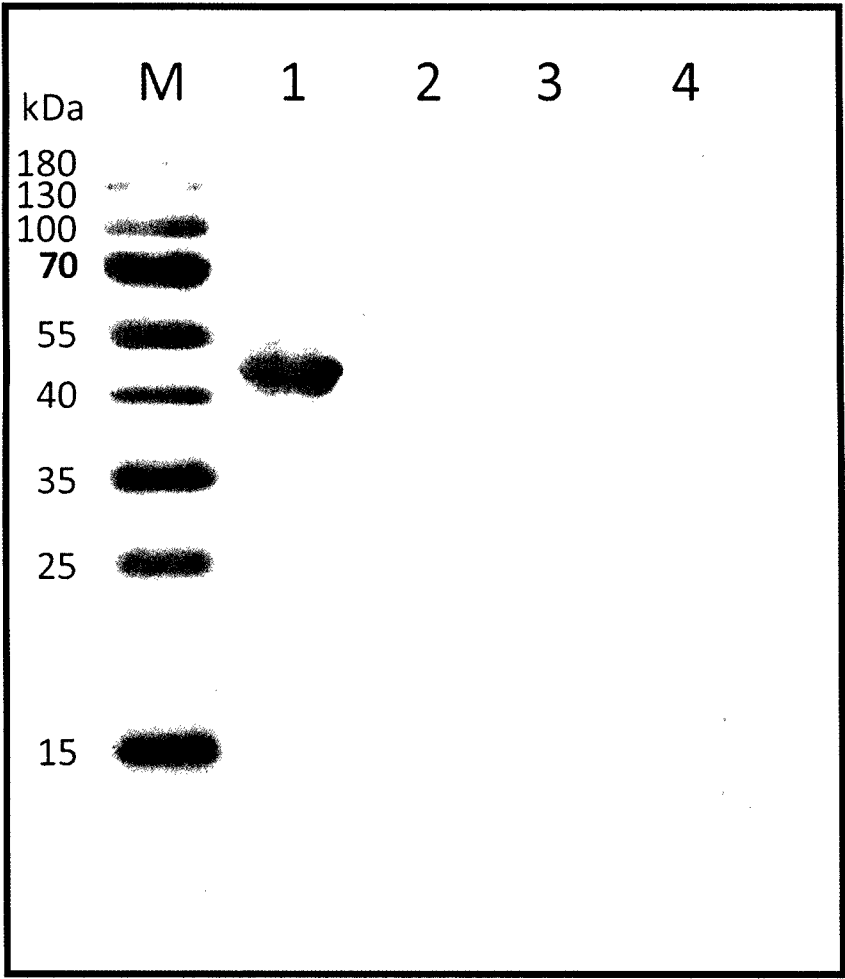
1. Monokloniniai antikūnai, atpažįstantys žmogaus PSEN1 geno 5'-nekoduojančios dalies 5' koduojamą peptidą, kurio seka apibūdinama SEQ ID Nr. 1.
2. Monokloniniai antikūnai pagal 1 punktą, atpažįstantys žmogaus PSEN1 geno 5'-nekoduojančios dalies 5' koduojamo peptido fragmentą PSEN1-11D1, kurio seka apibūdinama SEQ ID Nr. 2.
3. Monokloniniai antikūnai pagal 1 punktą, atpažįstantys žmogaus PSEN1 geno 5'-nekoduojančios dalies 5' koduojamo peptido fragmentą PSEN1-2C1, kurio seka apibūdinama SEQ ID Nr. 3.
4. Monokloninių antikūnų pagal 1 - 3 punktus panaudojimas PSEN1-49 peptido in vitro diagnostikoje.
5. Rinkinys, apimantis monokloninius antikūnus pagal 1 - 3 punktus ir konkurencinės imunofermentinės analizės metodui skirtus reagentus bei jų naudojimo instrukciją.

(A)
MTTTVRVLGRGLGQAAPGSAV <u>SHRKQNSGWSGRNLSYEPR</u> RQRGGGEAYT
(B)
5'-gatcgt tca cat cgg aaa caa aac agc ggc tgg tct gga agg aac ctg agc tac gag ccg cgg

1 pav.



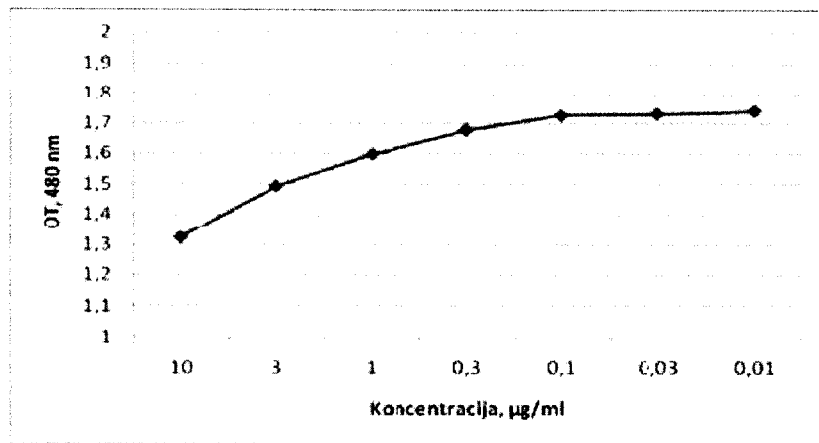
2 pav.



3 pav.

MTTTVRVLGRGLGQAAPGSAV <u>SHRKQNSGWSGRNLSYEPR</u> RRQRGGEAYT		
(1)	<u>SHRKQNSGW</u>	MAk 11D1
(2)	<u>KQNSGWSGR</u>	MAk 11D1
(3)	<u>SGWSGRNLS</u>	MAk 2C1
(4)	SGRNLSYEPR	-

4 pav.



5 pav.