

Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet



Ivana D. Lukić

**Terapeutski potencijal anti-tetanus
toksoid monoklonskih antitela: primena
zasnovana na vezivnim karakteristikama**

- doktorska disertacija –

Beograd, 2018.

**University of Belgrade
Faculty of Chemistry**



Ivana D. Lukić

**Therapeutic potential of anti-tetanus
toxoid monoclonal antibodies:
application based on binding properties**

- doctoral dissertation -

Belgrade, 2018.

Mentori:

Dr Marijana Stojanović

viši naučni saradnik Instituta za virusologiju, vakcine i serume – Torlak

Dr Marija Gavrović-Jankulović

redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Marijana Stojanović

viši naučni saradnik Instituta za virusologiju, vakcine i serume – Torlak, Beograd

Dr Marija Gavrović-Jankulović

redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Dr Radivoje Prodanović

vanredni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane

Ova doktorska disertacija je urađena u Odseku za naučno-istraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine i serume - Torlak u Beogradu. Predstavljeni rezultati dobijeni su tokom istraživanja predviđenih projektom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj (OII72049).

Izradom ove doktorske disertacije je rukovodila dr Marijana Stojanović, viši naučni saradnik Instituta za virusologiju, vakcine i serume – Torlak. Mojoj mentorki dugujem neizmernu zahvalnost na neprocenjivoj pomoći u planiranju i realizaciji eksperimenata, tumačenju rezultata i uobličavanju ovog rada. Hvala na ukazanom poverenju, podršci, velikom strpljenju, dragocenoj stručnoj pomoći i prijateljskim savetima.

Dr Mariji Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu dugujem neizmernu zahvalnost na korektnoj saradnji, podršci i pomoći.

Zahvaljujem se dr Radivoju Prodanoviću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na korektnoj saradnji i konstruktivnim sugestijama.

Veoma se zahvaljujem dr Aleksandri Inić Kanada na dragocenoj stručnoj pomoći, podršci i konstruktivnim koje su doprinele realizacije ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim kolegicama i prijateljicama dr Emiliji Marinković, Ani Filipović i Radmili Miljković na nesebičnoj pomoći oko izrade teze i na prijateljskoj podršci.

Najsrdahnije se zahvaljujem i ostalim kolegama iz Odseka za naučno-istraživački rad, Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak u Beogradu.

***Svoju doktorsku disertaciju posvećujem porodici, prvenstveno ćerki Mini.
Hvala vam na motivaciji, ljubavi i razumevanju bez kojih ne bih uspela!***

Ivana Lukić

Terapeutski potencijal anti-tetanus toksoid monoklonskih antitela: primena zasnovana na vezivnim karakteristikama

SAŽETAK

Tetanus toksin (TT), produkt anaerobne bakterije *Clostridium tetani*, je izuzetno potentan neurotoksin koji može izazvati tetanus, teško i često fatalno oboljenje. Uprkos višedecenijskom sistematskom sprovođenju vakcinacije protiv tetanusa, incidenca tetanusa još uvek nije zanemarljiva. TT-specifična antitela su ključni faktor u sprečavanju intoksikacije TT-om. Pored toga, predpostavlja se da bi ova antitela, usled ukrštene reaktivnosti, mogla doprinositi i otpornosti ka heterologim infekcijama. Kod osoba koja nemaju uspostavljen adekvatan TT-specifičan imunski odgovor, a postoji sumnja na intoksikaciju TT-om, preporučuje se imunoterapija koja podrazumeva aplikaciju TT-specifičnih antitela sposobnih da neutrališu slobodno cirkulišući TT. Duži niz godina se kao imunoterapeutici razmatraju i TT-specifična monoklonska antitela (MA_t) gde se kao jedan od problema nameće pitanje kako selektovati zaštitno MA_t i / ili formulisati efikasan preparat s obzirom da specifičnost ka TT ne znači nužno i zašitni potencijal.

Cilj ove doktorske disertacije je da se, kroz ispitivanje vezivnih karakteristika panela TT_d/TT-specifičnih MA_t i njihovog zašitnog potencijala *in vivo*, utvrdi na koji način i u kojoj meri vezivne karakteristike TT_d/TT specifičnih antitela određuju njihovu sposobnost da spreče intoksikaciju TT-om i / ili doprinesu otpornosti ka heterologim infekcijama.

Istraživanja realizovana u okviru izrade ove doktorske teze su pokazala da se zašitni potencijal anti-TT_d / TT antitela može proceniti na osnovu afiniteta ka TT-u i sposobnosti da inhibiraju TT-G_{D1b} interakciju. TT-specifična antitela koja mogu da spreče *in vivo* intoksikaciju TT-om treba da vezuju TT-om sa afinitetom $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ i da istovremeno imaju sposobnost da inhibiraju vezivanje TT-a za G_{D1b} gangliozide. Afinitet prema TT-u je prvi selekcionni kriterijum zašitnih TT-specifičnih antitela, a potom njihova sposobnost da preveniraju TT-G_{D1b} interakciju. Zašitni potencijal TT-

specifičnih antitela čiji je afinitet ka TT-u $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ dominantno određuje sposobnost inhibiranja TT-G_{D1b} interakcije a ne sam afinitet.

Analizom karakteristika vezivanja i zaštitnog potencijala preparata koji sadrže dva TTd/TT -specifična MAt u istim količinama (engl. *biclonal equimolar preparation*; BEP) pokazano je da se kombinovanjem dva TT-specifična MAt koja mogu istovremeno da interaguju sa TT-om i pri tome ispoljavaju pozitivan kooperativni efekat, može dobiti BEP čiji je zaštitni potencijal bolji u odnosu na MAt koji ulaze u njegov sastav. Povećanje zaštitnog kapaciteta je posledica promena karakteristika vezivanja BEP za TT u odnosu na njene konstituente u smislu efikasnije inhibicije uspostavljanja TT-G_{D1b} interakcije i rasta prosečnog afiniteta ka TT-u. TT-specifična MAt koja sama ne mogu da obezbede potpunu zaštitu od TT-intoksikacije mogu da budu značajni konstituenti TT-specifičnih BEP u slučajevima kada ispoljavaju pozitivne efekte na vezivanje drugog MAt koji ulazi u sastav BEP.

U okviru ove doktorske disertacije pokazano je i da TT-specifična antitela mogu, usled unakrsne reaktivnosti, interagovati sa hlamidijalnim antigenima i doprineti ublažavanju kliničke slike u slučaju okularne hlamidijalne infekcije. Pokazano je da postoji određen stepen homologije između TT i hlamidijalnih proteina na nivou primarne strukture, a direktnom ELISA-om i pri *Western blot*-om je pokazana unakrsna reaktivnost TTd/TT-specifičnih MAt. U *in vitro* modelu je pokazano da anti-TTd/TT MAt mogu specifično da inhibiraju hlamidijalnu infekciju i da stepen inhibicije zavisi od vezivnih karakteristika MAt i infektivne doze. U modelu inkluzionog konjunktivitisa zamorčica je pokazano da anti-TTd/TT MAt ne mogu u potpunosti da prevenira okularnu hlamidijalnu infekciju ali da njihova lokalna primena tokom akutne faze infekcije može značajno ublažiti kliničku sliku.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da karakteristike vezivanja TT-specifičnih antitela određuju njihov zaštitni potencijal u slučaju intoksikacije TT-om, kao i doprinos u otpornosti ka heterologim infekcijama. Definisanjem parametara koji najznačajnije određuju zaštitni potencijal TT-specifičnih MAt stvoreni su preduslovi za efikasnu *in vitro* selekciju zaštitnih anti-TTd/TT MAt a time i smanjenje potrebe za *in vivo* testiranja u životinjskim modelima.

Ključne reči: monoklonska antitela, tetanus toksin, vezivne karakteristike, kooperativni efekat, zaštitni i terapijski potencijal, unakrsna reaktivnost.

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Imunologija

UDK broj: 577.27

Therapeutic potential of antioxidant anti-tetanus monoclonal antibodies: application based on binding properties

ABSTRACT

Tetanus toxin (TT), a product of an obligate anaerobic bacteria *Clostridium tetani*, is an extremely potent neurotoxin that can cause tetanus, a severe and often fatal disease. Mandatory vaccination against tetanus is introduced worldwide and it was crucial for a significant decline of tetanus cases. Nevertheless, the prevalence of the disease is not negligible, particularly in the developing world. Antibodies capable to neutralize TT are key factors in protection against tetanus disease. It is assumed that antibodies may, due to cross-reactivity, contribute to the immunity against heterologous pathogens. TT intoxications can be efficiently treated with various polyclonal antibody-based therapies. Although antibody-based therapeutics for treatment of tetanus exist on the market its production is tedious. Monoclonal antibodies (MAbs) are considered for a long time as a reagent of choice, but the core drawback is how to select a MAb and how to prepare oligoclonal MAbs-based preparation that would be safe in providing efficacious protection, since available data clearly demonstrate that the ability of a single MAb to bind TT does not necessarily mean that this MAb protects from tetanus intoxication.

The aims of this thesis were to evaluate the binding characteristics and protective capacity of TTd/TT-specific MAb(s)-based preparations, to determine how these binding characteristics correlate with the observed *in vivo* effects and to investigate whether these preparations could contribute to the development of heterologous immunity.

In this PhD thesis, we showed that the selection of protective anti-TTd/TT MAbs can be performed by the *in vitro* testing combining two assays: (i) the measurement of MAb affinity toward TT (ii) the evaluation of its capability to prevent TT-ganglioside interaction. TT-specific antibodies that prevent *in vivo* TT intoxication bind TT with affinity $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and, at the same time, possess the ability to inhibit binding of TT to

G_{D1b} ganglioside. MAb's affinity toward TT is the first selection criterion of protective TT-specific antibodies, and the second criterion is their ability to prevent TT-G_{D1b} interaction. The protectiveness of TT-specific antibodies having affinity for TT $\geq 1 \times 10^8$ M⁻¹ has been determined by the ability to inhibit TT-G_{D1b} interaction and not by the affinity alone.

The evaluation of binding characteristics of six bivalent equimolar preparations (BEPs) of TT-specific MAbs and their protective capacity revealed that a combination of TT-specific MAbs, which not only bind TT but also exert positive cooperative effects, results in a MAb-based BEPs with superior binding characteristics and protective capacity, when compared to the individual MAbs. The increase in protectiveness of MAb-based BEPs is due to the increase in their affinity/potency and inhibitory effect on TT-G_{D1b} interactions. We showed that a MAb with a partial protective capacity which exerts positive effects on the binding of the other BEP MAb component can be used as a valuable constituent of the MAb-based BEPs.

Here we further showed that TTd/TT-specific antibodies, due to their cross-reactivity, could interact with heterologous antigens from *Chlamydia* and consequently diminish the intensity of ocular pathology in guinea pigs. There is a structural similarity between TT and *Chlamydial* proteins at the level of short peptide sequences, and binding of anti TT/TTd MAbs for chlamydial proteins was confirmed in a direct ELISA and Western blot. We showed that anti-TTd/TT MAbs could profoundly inhibit *in vitro* infection of human epithelial cells with *Chlamydia*, as well as that the degree of inhibition depends on the MAb's binding characteristics and the infectious dose. The *in vivo* protective potential of anti TTd/TT MAbs was assessed in the model of inclusion conjunctivitis in guinea pigs. We showed that anti-TTd/TT MAbs, although not able to completely inhibit the ocular chlamydial infection, could significantly decrease the intensity of ocular pathology when applied locally during the acute phase of infection.

The results presented in this thesis represent the clear evidence that TT-specific antibodies' binding characteristics determine antibodies protective potential in case of TT intoxication and could contribute to the protection against heterologous infections. *In vitro* screening of TT-specific preparations based on their affinity and inhibitory effect on TT-G_{D1b} interactions may permit the rational selection of MAb-based preparations with high protective capacity against TT intoxication *in vivo*. The selection

of predictive *in vitro* parameters is of great importance for the efficient and quick manufacturing of anti-tetanus antibodies as well as for the reduction of animal usage when experimentating with tetanus toxin.

Key words: monoclonal antibodies, tetanus toxin, binding properties, cooperative effect, protective and therapeutic potential, cross-reactivity.

Scientific field: Biochemistry

Scientific subfield: Immunology

UDC number: 577.27

SKRAĆENICE

At - antitelo

Ag - antigen

MA_t - monoklonsko antitelo

MA_t-B - monoklonsko antitelo obeleženo biotinom

PA_t - poliklonsko antitelo

TT - tetanus toksin

TT_d - tetanus toksoid

H_c - teški lanac tetanus toksina (eng. *heavy chain*)

L_c - laki lanac tetanus toksina (eng. *light chain*)

GABA - gama-aminobuterna kiseline

GPI pridruženi proteini - proteini povezani sa glikofosfoinozitolom

VAMP - vezikulama pridruženi membranski protein (eng. *vesicle-associated membrane protein*)

WHO - Svetska Zdravstvena Organizacija (engl. *World Health Organisation*)

AS - amonijum sulfat

HIC - hidrofobna hromatografija

IMAC - imobilisani metal – afinitetna hromatografija

G_{D1b} - polisijalo-gangliozid serije D1b

TIG - tetanusni imunoglobulini (engl. *tetanus immunoglobulins*)

IVIG - polivalentni imunoglobulini za intravensku primenu (engl. *intravenous immunoglobulins*)

DTP_{er} vakcina - vakcina protiv tetanusa, difterije i pertusisa

ET - elementarno telo

RT - retikularno telo

PN - proteinski azot

TN - totalni azot

K_a - konstanta afiniteta

k_{on} – konstanta brzine asocijacije

i.p. - intraperitonealno
i.v. - intravenski
2LD₅₀ - letalna doza
BEP - biklonalni ekvimolarni preparati
IA - indeks aditiviteta
MA_{t,50%} - koncentracije slobodnih analiziranih MA_t-B u rastvoru gde je 50% TT vezano za određeno MA_t-B
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
CRAb - himernih bi-specifičnih helirajući fragmenati (eng. *chelating recombinant antibodies*)
Ct - *Chlamydia trachomatis*
Cc - *Chlamydia caviae*
CtA - *Chlamydia trachomatis* serovar A
CtB - *Chlamydia trachomatis* serovar B
PmpC - polimorfni membranski protein C
MOMP - *Major Outer Membrane Protein*
HcjE - epitelijalne ćelije humane konjunktive
CALT - *conjunctiva-associated lymphoid tissue*
ELISA - *enzyme linked immunoadsorbent assay*
PBS - fosfatom puferisan fiziološki rastvor
OPD - o-fenilendiamin
SDS-PAGE - Natrijum dodecil sulfat- poliakrilamid gel elektroforeza
APS - amonijum persulfat
SDS - natrijum dodecilsulfat
TEMED - N, N, N', N'- tetrametiletildiamin
PAAG - poliakrilamidni gel
BSA - goveđi serum albumin
NBT - *nitro blue tetrazolim*
BCIP - 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat
Pcc - *Pearson*-ov korelacioni koeficijent,
P - statistička značajnost

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1 Tetanus toksin i tetanus	5
2.2 Prevencija i terapija tetanusa	9
2.2.1 Proizvodnja vakcine protiv tetanusa	9
2.2.2 Prečišćavanje TT-a i TTd-a	10
2.2.3 Imunoterapija: preparat na bazi TT-specifičnih At	12
2.2.3.1 TT-specifični preparati bazirani na poliklonskim antitelima u terapiji tetanusa	12
2.2.3.2 Primena preparata baziranih na monoklonskim antitelima u terapiji tetanusa	13
2.3 Heterologi efekti vakcinacije protiv tetanusa	16
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
4. NAŠI RADOVI	21
4.1 Ispitivanje vezivnih karakteristika anti-TTd/TT MAt	22
4.1.1 Lokalizacija epitopa selektovanih anti-TTd/TT MAt	22
4.1.2 Određivanje konstante afiniteta i brzine uspostavljanja selektovanih anti-TTd/TT MAt ka TT molekulu	25
4.1.3 Zaštitni potencijal selektovanih anti-TTd/TT MAt	26
4.1.4 Terapeutski potencijal anti-TTd/TT MAt	30
4.1.5 Korelaciona analiza zaštitnog potencijala i vezivnih karakteristika anti-TTd/TT MAt	33
4.2 Značaj kooperativnog vezivanje anti-TTd/TT MAt u dizajniranju preparata za prevencu intoksikacije tetanus toksinom	36
4.2.1 Ispitivanje mogućnosti simultanog vezivanja anti-TTd/TT BEP za TT	37
4.2.2 Uzajamni uticaj anti-TTd/TT MAt pri vezivanju za TT	38

4.2.3	Veživne karakteristike TT-specifičnih-BEP	41
4.2.4	Zaštitni potencijal TT-specifičnih BEP	43
4.2.5	Terapeutski potencijal TT-specifičnih BEP	47
4.3	Heterologa imunost pokrenuta imunizacijom tetanus toksoidom:	
	okularne hlamidijalne infekcije	50
4.3.1	Strukturna sličnost TT i proteina bakterija iz roda <i>Chlamydia</i> ..	50
4.3.2	Unakrsna reaktivnost anti-TTd/TT MAt i hlamidijalnih proteinima	54
5.	EKSPERIMENTALNI RAD	61
5.1	Antitela i antigeni	61
5.1.1	Proizvodnja MAt u <i>Integra Cell Line</i> bocama	61
5.1.2	Izolovanje MAt afinitetnom hromatografijom na <i>HiTrap</i> <i>Protein G</i> koloni	61
5.1.3	Obeležavanje MAt biotinom	62
5.1.4	Prečišćavanje TT i TTd hidrofobnom hromatografijom	63
5.1.5	Bakterije iz roda <i>Chlamydia</i>	63
5.2	Određivanje koncentracije proteina	64
5.2.1	Određivanje koncentracije proteina <i>Bradford</i> -ovom metodom...	64
5.2.2	Kjeldalova metoda za određivanje ukupanog azota i proteinskog azota	65
5.2.3	Određivanje koncentracije proteina merenjem apsorbance na 280 nm	65
5.2.4	Određivanje koncentracije proteina bicinhonskom kiselinom....	65
5.3	Elektroforeza i <i>Western blot</i> analiza	66
5.3.1	Natrijum dodecil sulfat- poliakrilamid gel elektroforeza	66
5.3.2	Bojenje gelova	67
5.3.3	<i>Western blot</i> analiza	67
5.4	<i>In vitro</i> ispitivanje veživnih karakteristika MAt primenom	
	ELISA testa	69
5.4.1	Određivanje imunogenosti TTd-a	70
5.4.2	Reaktivnosti selektovanih MAt ka TT i TTd	70
5.4.3	Unakrsna reaktivnost anti-TTd/TT MAt ka proteinima bakterija iz roda <i>Chlamydia</i>	70

5.4.4	Određivanje pozicije epitopa koji prepoznaju anti-TTd/TT MAt u molekuli TT, sposobnost MAt da vežu TT u rastvoru i spreče vezivanje TT za gangliozyd	71
5.4.5	Određivanje konstante afiniteta interakcije anti-TTd/TT MAt/TT	73
5.4.6	Određivanje konstante brzine uspostavljanja interakcije anti-TT MAt/TT	74
5.4.7	Određivanje indeksa aditiviteta anti-TTd/TT MAt	74
5.4.8	Određivanje <i>in vitro</i> potence BEP	75
5.4.9	Kooperativni efekat vezivanja dva MAt	76
5.5	Ispitivanje sposobnosti anti-TTd/TT MAt da <i>in vitro</i> spreče infekciju HCjE ćelija sa CtB	77
5.6	<i>In vivo</i> ispitivanja	78
5.6.1	Određivanje dužine poluživota ($t_{1/2}$) MAt u cirkulaciji	78
5.6.2	Zaštitni potencijal anti-TTd/TT MAt	79
5.6.3	Terapeutski potencijal anti-TTd/TT MAt	80
5.6.4	Ispitivanje sposobnosti anti-TTd/TT MAt da spreče okularnu hlamidijalnu infekciju zamorčića	80
5.7	Poređenje aminokiselinskih sekvenci	82
5.8	Statistička analiza	83
6.	ZAKLJUČCI	84
7.	LITERATURA	87
8.	PRILOZI	99
8.1	Karakteristike antitela i antigena korišćenih u radu	99
8.1.1	Anti-TTd/TT monoklonska antitela	99
8.1.2	Karakteristike TTd i TT preparata dobijenih prečišćavanjem HIC-om	101
8.	OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE ...	i
9.	BIOGRAFIJA AUTORA	ii
10.	IZJAVA O AUTORSTVU	iii
11.	IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA	iv
12.	IZJAVA O KORIŠĆENJU	v

1. UVOD

Clostridium tetani je anaerobna sporogena bakterija koja produkuje jedan od najpotentnijih neurotoksina, tetanus toksin (TT). *C. tetani* je široko rasprostranjena u prirodi i otporna je na uslove spoljašnje sredine što rezultuje velikom mogućnošću infekcije ovom bakterijom^{1,2}. *C. tetani* tj. TT koji ona produkuje je uzrok tetanusa, bolesti koja ima izuzetno tešku kliničku sliku i u velikom procentu fatalan ishod. Kod osoba koje nemaju razvijen specifičan imunitet na TT, letalna doza TT-a iznosi 1 ng po kilogramu telesne mase³.

S obzirom da se toksični efekti TT ispoljavaju vrlo brzo, znatno brže nego što se uspostavlja specifičan imunski odgovor na TT od ključne je važnosti da pri kontaktu sa *C. tetani* jedinice imaju već uspostavljen imunski odgovor protiv TT. Vakcinacija tetanus toksoidom (TTd), hemijski inaktivisanom formom TT koja nije toksična ali ima očuvane antigene karakteristike TT-a, je najefikasniji način za prevenciju tetanusa. Višedecenijsko sistematsko sprovođenje vakcinacije TTd-om dovelo je do značajnog smanjenja slučajeva tetanusa u razvijenim zemljama gde su slučajevi tetanusa zabeleženi najčešće u starijoj populaciji stanovništva koja je, zbog postepenog smanjenja specifične imunosti ka TT-u, nedovoljno zaštićena⁴. Međutim, posmatrano globalno, incidenca tetanusa još uvek nije zanemarljiva. Povećana incidenca tetanusa beleži se i tokom elementarnih nepogoda (zemljotresi, cunami, uragani, itd) kada, usled povećane incidence trauma, dolazi do povećane incidence infekcija sa *C. tetani*⁵.

Brojna istraživanja su pokazala da su TT-specifična antitela (At) ključna za zaštitu od TT intoksikacije i da stepen zaštite direktno korelira sa koncentracijom TT-specifičnih antitela u serumu. Preparati koji se danas primenjuju u humanoj populaciji (tzv. antitetanusni serumi) najčešće su bazirani na poliklonskim antitelima izolovanim iz plazme zdravih dobrovoljnih davalaca krvi^{5,6}, a koriste se i heterologi, životinjski, antitetanusni serumi^{5,7}. Proizvodnja ovih preparata je dugotrajna i količine koje se mogu

proizvesti u kratkom vremenskom intervalu su limitirane. Pored toga, način njihove proizvodnje je takav da im sastav, a time i jedinična efikasnost, varira (tzv. *batch-to-batch* nekonzistentnost)⁸, neophodna je intenzivna mikrobiološka kontrola, a primena heterologih preparata povezana je i sa mogućnošću pojave imunske reakcije na sam preparat⁹.

Duži niz godina TT-specifična monoklonska antitela (MAAt) se razmatraju kao alternativa antitetanusnim serumima¹⁰. Preparat na bazi jednog ili više anti-TTd/TT MAAt bi imao konzistentan sastav^{11,12}, i kao takav bi se mogao proizvoditi u neograničenim količinama. Jedna od glavnih prepreka u formulisanju ovakvog preparata je selekcija MAAt koji može da obezbedi zaštitu pri intoksikaciji TT-om. Činjenica da antitelo interaguje sa TT-om ne znači nužno da to antitelo ima zaštitni potencijal.¹³ Pokazano je da određena antitela koja interaguju sa epitopima TT-a lociranim u regionu kojim se TT vezuje za neuron (C-terminalni deo teškog lanca) nisu protektivna¹⁴, dok su određena antitela specifična za epitope lakog lanca TT-a sprečavala razvoj tetanusa¹⁵⁻¹⁷.

S obzirom da je *in vivo* ispitivanje zašitnog potencijala svakog pojedinačnog MAAt zahtevan, dugotrajan i etički problematičan pristup, definisanje parametara koji se mogu odrediti *in vitro* i na osnovu njih predvideti zašitni potencijal anti-TTd/TT MAAt bi bilo od velikog značaja.

S druge strane, iako MAAt poseduju određenu specifičnost ka ciljnom antigenu (Ag), visoko specifično prepoznavanje može da utiče na odsustvo vezivanja datih MAAt u slučaju odsustva ili modifikacija ciljnog epitopa infektivnog agensa¹⁸. Takođe, potencia MAAt (naročito onih koji imaju sposobnost neutralizacije patogena ili toksina) uglavnom je niska u poređenju sa poliklonskim preparatima. Sposobnost neutralizacije patogena ili toksina pojedinačnim MAAt zavisi od funkcionalnog značaja specifičnih antigenskih epitopa i od afiniteta MAAt ka ciljnom epitopu. Ujedno, vezivanje pojedinačnog MAAt za ciljni antigen (kao što je toksin) dovodi do formiranja relativno malih imunokompleksa jer se za jedan molekul antigena može vezati jedno MAAt (osim u retkim slučajevima kada na molekulu Ag postoje repetitivni epitopi)^{12,19-21}.

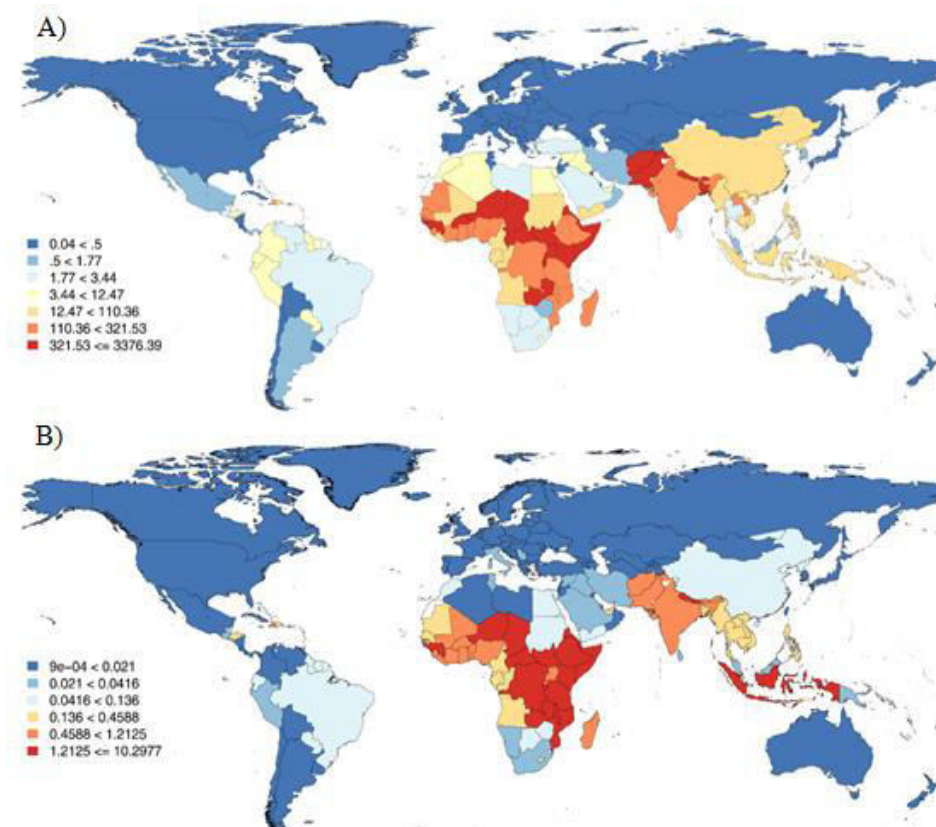
Pokazano je da preparati koji sadrže dva ili više MAAt efikasnije pokreću efektorske mehanizme i samim tim imaju veći protektivni kapacitet u odnosu na preparate sa pojedinačnim MAAt na primerima tetanus toksina^{16,17,22}, botulinum toksina²³⁻²⁶ ili toksinu antraksa²⁷.

Pored toga, u literaturi su dostupni podaci koji ukazuju da realizacija određenih imunizacionih protokola može uticati na ishod infekcije heterologim mikroorganizmima²⁸⁻³⁴. Mehanizmi koji su u osnovi ove povezanosti nisu dovoljno objašnjeni. Pored toga, radovi više grupa, direktno ili indirektno, ukazuju na strukturnu homologiju TT i drugih nesrodnih proteina što ostavlja mogućnost da ti proteini budu prepoznati od strane anti-TTd/TT antitela usled ukrštene reaktivnosti³⁵. Tako je pokazano i da je nivo antitela koja se u određenim dijagnostičkim testovima vezuju za antigene hlamidije znatno veći kod osoba koje su imunizovane, između ostalog, i TTd-om u poređenju sa osobama koje nisu imunizovane^{36,37}. Ovi rezultati ukazuju da vakcinacija protiv tetanusa može doprineti otpornosti organizma na hlamidijalne infekcije.

2. OPŠTI DEO

TT je izuzetno potentan neurotoksin (letalna doza TT-a iznosi 1 ng po kilogramu telesne mase)³ koji kod osoba koje nemaju uspostavljen TT-specifičan imunski odgovor može izazvati tetanus, teško i u velikom broju slučajeva fatalno oboljenje.

Tokom 2015. godine zabeleženo je oko 60 000 smrtnih slučajeva zbog tetanusa, od toga je ~20 000 smrtnih slučajeva uzrokovanih neonatalnim tetanusom (Slika 2.1)³⁸.



Slika 2.1. Mortalitet stanovnika tokom 2015. godine uzorkovan neonatalnim tetanusom (A) i generalizovanim tetanusom (B). U donjem desnom uglu naznačen je prosečan broj smrtnih slučajeva uzorkovanih tetanusom na 100 000 stanovnika. BMC Public Health (2017) 17:179-38

Tetanus karakteriše jak spazam muskulature. Smrt usled tetanusa uglavnom nastupa zbog disfunkcije u centralnom i autonomnom nervnom sistemu, koje se potom odražavaju na kardiovaskularni, respiratorni i endokrini sistem³⁹. Zbog brzog razvoja bolesti tetanus se dijagnostikuje isključivo na osnovu kliničke slike koju karakteriše:

- prisustvo povrede
- trismus (nesposobnost otvaranja usta),
- spazmi facijalnih mišića (lat. *facies tetanica*),
- bolne mišićne kontrakcije ekstremiteta i drugih mišića^{39,40}.

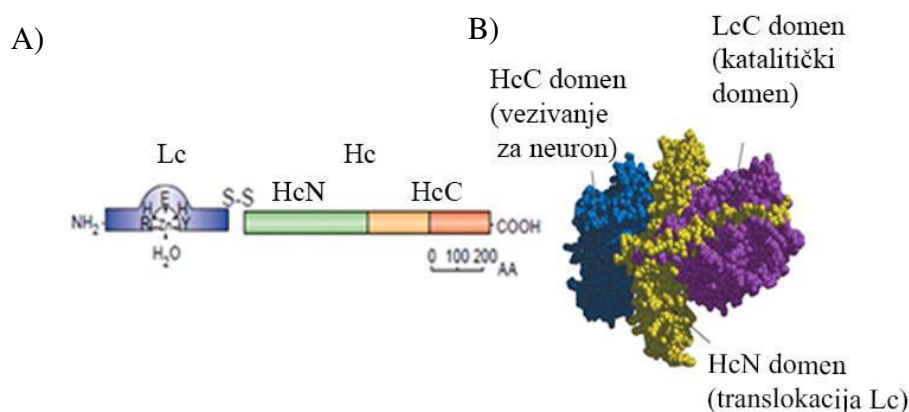
2.1 Tetanus toksin i tetanus

TT je protein težine oko 150 kDa i sastoji se od dva polipeptidna lanca označena kao teški (eng. *heavy chain*, Hc; ~100 kDa) i laki (eng. *light chain*, Lc; ~50 kDa) lanac. Hc i Lc su međusobno povezani disulfidnom vezom i nekovalentnim interakcijama (Slika 2.2)^{1,41-44}. Funkcionalno, TT se sastoji od tri domena:

(1) C-terminalni domen Hc (50 kDa; HcC) u okviru koga se definišu dva pod-domena od po 25kDa: HcCC pod-domen kojim se TT vezuje za receptore na površini neurona i HcCN (*lectin-like*) pod-domen koji ima ulogu u prepoznavanju oligosaharidnih komponenti receptora⁴¹;

(2) N-terminalni domen Hc (50 kDa; HcN), domen koji je neophodan za formiranje pore u endocitotskoj vezikuli kroz koju se L lanac TT-a translocira u citosol neurona gde ispoljava svoje toksično dejstvo^{41,43,45};

(3) Lc, Zn²⁺ - zavisna endopeptidaza koja svojim dejstvom dovodi do inhibicije otpuštanja neurotransmitera glicina i gama-aminobuterne kiseline (GABA) i samim tim do nastanka tetanusa.^{43,44,46,47}



Slika 2.2. Šematski prikaz strukture TT: A) Laki i teški lanac TT-a međusobno povezani disulfidnom vezom; B) Prikaz trodimenzionalne strukture TT sa naznačenim funkcionalnim domenima⁴⁸.

Nakon infekcije, *C. tetani* u anaerobnim uslovima autolizom oslobađa TT^{1,44}. Mehanizam nastanka tetanusa je vrlo složen i u određenim segmentima nedovoljno ispitan. Generalno, TT u nervni sistem ulazi preko motornih neurona, ali svoje toksično dejstvo ispoljava na nivou inhibitornih neurona. TT dovodi do nastanka tetanusa kroz nekoliko koraka koji uključuju:

(1) Vezivanje TT-a za presinaptičku membranu perifernih motoneurona^{41,43,45}.

TT se cirkulacijom prenosi do nemijelizovanih delova presinaptičke membrane motornih neurona i drugih holinergičnih sinapsi gde interaguje sa lipidnim domenima koji sadrže visoke koncentracije holesterola, polisijalogangliozida i proteina povezanih sa glikofosfoinozitolom (GPI-pridruženi proteini). Kompleksni polisijalo-gangliozidi kao što su G_{D1a}, G_{D1b}, G_{Q1b} i G_{T1b} u membranama motornih neurona imaju ključnu ulogu u specifičnom vezivanju Hc TT-a za nervne ćelije⁴⁹.

Osim sa polisijalo-gangliozidima, pretpostavlja se da TT interaguje i sa proteinima sinaptičkih vezikula⁵⁰.

(2) Internalizacija TT-a endocitozom^{43,44}.

Nakon vezivanja za proteinski receptor, TT biva internalizovan zajedno sa sinaptičkim vezikulama koje recirkulišu.

(3) Retrogradni aksonalni transport TT-a^{43,44,51}.

Polisijalogangliozidi se ne internalizuju u motorne neurone i smatra se da time doprinose retrogradnom transportu TT-a⁴³. Retrogradnim transportom TT zaobilazi endosomalni i lizozomski put degradacije i prenosi se duž motornog neurona i otpušta

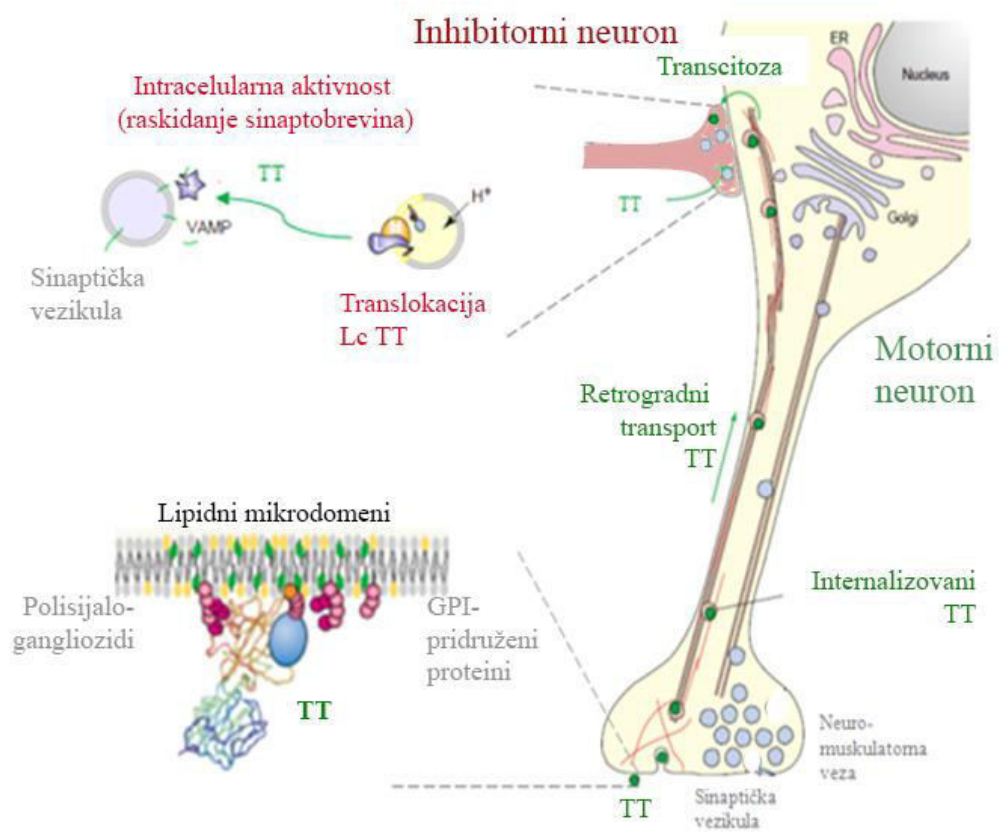
se u sinaptičku pukotinu gde biva preuzet od strane inhibitornih neurona smeštenih u kičmenoj moždini.

(4) Translokacija TT-a u inhibitorne neurone.

Ulazak TT-a u inhibitorne neurone se dešava endocitozom pomoću sinaptičkih vezikula⁵¹. U lumenu sinaptičkih vezikula koje endocituju TT snižava se pH dejstvom protonske ATP-azne pumpe. Snižavanje pH u lumenu vezikula je esencijalno za dejstvo TT-a, jer pri niskom pH dolazi do konformacione promene u molekulu TT-a čime on postaje hidrofobniji.⁵² U takvoj konformaciji TT se insertuje u lipidni dvosloj membrane vezikule i tako da N-domen Hc TT-a formira selektivni katjonski kanal i deluje kao šaperon tj. učestvuju u promeni konformacije Lc i omogućavaju njegov prolazak kroz kanal. Pri prolasku kroz HcN kanal dolazi do raskidanja disulfidne veze između Hc i Lc čime se Lc oslobađa u citosol inhibitornog neurona gde ispoljava svoju toksičnu aktivnost^{1,43,44,53}.

(5) Inhibicija oslobađanja inhibitornih neurotransmitera.

Lc je visoko specifična Zn^{2+} - zavisna endopeptidaza čija je aktivnosti usmerena ka vezi između Gln⁷⁶-Phe⁷⁷ u molekulu sinaptobrevin-2⁵⁴. Sinaptobrevin-2, poznat i kao VAMP (eng. *vesicle-associated membrane protein*), je deo SNARE kompleksa proteina (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor*) koji se nalazi na vezikularnoj membrani i ima važnu ulogu u fuzionisanju vezikula u kojima se nalaze neurotransmiteri i ćelijske membrane⁴³. Proteoliza sinaptobrevina-2 dovodi do izostanka fuzije vezikule i membrane neurona, a time i izostanka oslobađanja inhibitornih neurotransmitera (glicin i GABA) koji su posrednici inhibitornog delovanja sekundarnih interneurona na motoneurone. Posledica odsustva inhibitornih neurotransmitera u nervno-mišićnoj sinapsi je hiperaktivnost motornih neurona (izostanak relaksacione faze kontrakcije) usled prekomerne stimulacije motoneurona acetilholinom. To dovodi do nastanka paralize uzrokovane spazmom poprečno-prugastih mišića i nastanka vrlo teškog, često smrtonosnog, oboljenja - tetanusa (**Slika 2.3**)^{43,44}.



Slika 2.3. Šematski prikaz motornog i inhibitornog neurona i mehanizam nastanka tetanusa. Nakon interakcije TT polisijaloglikanima i GPI-pridruženim proteinima u okviru mikrolipidnih domena na membrani motornog neurona, TT se internalizuje i retrogradnim transportom prenosi do kičmene moždine gde se prenosi u inhibitorni neuron. U okviru inhibitornog neurona TT ispoljava svoju intracelularnu aktivnost – raskidanje sinaptobrevina.

2.2. Prevencija i terapija tetanusa

Vakcinacija je proces kojim se stimuliše uspostavljanje zaštitnog adaptivnog imunskog odgovora na patogene mikroorganizme ili njihove toksine. Imunizacija proteinima mikroorganizama ili njihovim inaktiviranim toksinima (toksoidima) indukuje imunski odgovor u okviru kog je funkcionano najznačajnija stimulacija produkcije antitela koja se specifično vezuju za mikroorganizme i/ili njihove toksine i potom pokreću kaskadu direktnih i indirektnih efektorskih mehanizama⁵⁵.

Vakcinacija TTd-om, hemijski inaktivisanom, netoksičnom formom, TT-a je jedini efikasan način prevencije tetanus. Vakcinacija protiv tetanusa se izvodi primenom monovalentne vakcine gde je TTd jedini imunizacioni antigen ili primenom polivalentnih vakcina gde je TTd u smeši sa antigenima bakterijskog i virusnog porekla⁵⁵. Od druge polovine XX veka, u skladu sa preporukama Svetske Zdravstvene Organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO), imunizacija protiv tetanusa je u redovnom programu imunizacije velikog broja zemalja⁵⁶. Višedecenijsko sistematsko sprovođenje vakcinacije TTd-om rezultovalo je značajnim padom incidence tetanusa, takvim da je u razvijenim zemljama uglavnom reč o sporadičnim slučajevima⁶. Na globalnom nivou zabeležen drastičan pad incidence tetanusa (u periodu od 1990-2015 godine mortalitet zbog neonatalnog tetanusa je smanjen za 90%, a za generalizovani oblik za 80%)³⁸.

2.2.1 Proizvodnja vakcine protiv tetanusa

Proces proizvodnje vakcine protiv tetanus podrazumeva kultivaciju vakcinalnog soja *C. tetani*, inaktivaciju sekretovanog TT tretmanom formaldehidom kao i postupke prečišćavanja i karakterizacije dobijenih TT derivata⁵⁷.

Kultivacija *C. tetani* vrši se na *Müller-Miller* podlozi, na 35 °C, u anaerobnim uslovima. Količina TT u kulturi je najveća između 5 i 7 dana kultivacije kada, nakon eksponencijalne faze rasta bakterijske kulture, dolazi do lize bakterijskih ćelija.

Supernatant bakterijske kulture u kome se nalazi TT se centrifugiranjem odvaja od bakterijskih ćelija i njihovih fragmenata. Inaktivacija TT tj. njegovo prevođenje u toksoidnu formu se radi dodavanjem formaldehida koji indukuje ireverzibilno formiranje novih inter- i intralančanih kovalentnih veza u molekulu TT^{45,57,58}.

Standardni postupak prečišćavanja TTd podrazumeva frakciono taloženje proteina amonijum sulfatom (AS)⁵⁹. Uklanjanje soli iz rastvora dobijenog rastvaranjem taloga TTd-a vrši se dijalizom, gel filtracijom, jonoizmenjivačkom hromatografijom ili kombinacijom ovih metoda. Poslednji korak prečišćavanja je filtracija rastvora TTd kroz filtre čije su pore prečnika 0,2 μm čime se obezbeđuje sterilnost rastvora.

Prečišćeni TTd se u poslednjoj fazi proizvodnje vakcine kombinuje sa adjuvansom (monovalentne vakcine) i sa drugim vakcinalnim antigenima (polivalentne vakcine). Iako sami nisu imunogeni, adjuvansi deluju kao imunomodulatori/imunostimulatori i/ili predstavljaju depo vakcinalnog antigena i omogućavaju njegovo postepeno oslobađaju, čime se postiže prolongirana stimulacija imunskog sistema⁵⁵. Kao adjuvansi u vakcini protiv tetanusa koriste se jedinjenja aluminijuma, aluminijum fosfat i aluminijum hidroksid⁶⁰.

2.2.2 Prečišćavanje TT-a i TTd-a

U standardnoj proizvodnji prečišćavanje / TTd-a se zasniva na precipitaciji AS-om. Povećanjem koncentracije AS dolazi do isoljavanja ("salting out") efekta usled čega dolazi do precipitacije proteina. Prema literaturnim podacima TTd precipitira u rastvorima gde je zasićenje AS-a 40 %⁵⁹. Budući da veliki broj proteina precipitira pri ovom zasićenju AS postoji velika mogućnost koprecipitacije "ne TTd" proteina.

U cilju unapređenja proizvodnog postupka, intezivno se razmatra i mogućnost prečišćavanja TT/TTd hromatografskim tehnikama⁶¹. Osnovna prednost upotrebe hromatografskih tehnika za prečišćavanje TT/TTd-a, pored jednostavne manipulacije i brzine rada, ogleda se u mogućnosti dobijanja preparata veće čistoće i lakše standardizacije postupka. Do sada je najviše razmatrana mogućnost prečišćavanja TTd-a gel-filtracijom. Ograničavajući faktor ovog načina prečišćavanja predstavlja tendencija TTd-a da u rastvorima visoke koncentracije formira agregate. Stoga, skupljanje frakcija

u uskom opsegu molekularnih masa rezultuje preparatom zadovoljavajuće čistoće, ali smanjenog prinosa. Sa druge strane, skupljanje frakcija u širem opsegu molekularnih masa povećava mogućnost kontaminacije drugim proteinima koji se nalaze u filtratima kulture *C. tetani*^{62,63}.

Literaturni podaci o strukturi TT-a ukazuju na opravdanost razmatranja sledećih hromatografskih tehnika:

a) Hidrofobna hromatografija

Hidrofobna hromatografija (HIC) je tehnika kojom se supstance razdvajaju na osnovu razlike u jačini interakcija sa hidrofobnim matriksom. Intezitet tih interakcija prvenstveno zavisi od hidrofobnosti površine proteina. Analizom amino kiselinske sekvence je pokazano da na površini Hc TT-a u nativnoj konformaciji postoje hidrofobni regioni⁶⁴, što predstavlja osnov za razmatranje HIC-a kao pristupa za prečišćavanje TT-a. U molekulu TT-a se nalaze brojne hidrofobne sekvence dužine do 10 aminokiselina, kao i dve duže hidrofobne sekvence – jedna na Lc (od Tyr²²³ do Ile²⁵³), a druga na N-terminusu Hc-a (od Asn⁶⁶⁰ do Ala⁶⁹¹).⁴⁵ Rezultati analiza vezivanja Triton X-100 za TT-a i sposobnosti TT-a da formira kanale u fosfolipidnim vezikulama takođe impliciraju da se hidrofobnost N-terminusa teškog lanca može povećati sniženjem pH⁶⁵.

b) Imobilizovana metal-afinitetna hromatografija

u nativnoj konformaciji TT-a postoji sedam His ostataka na HcC domenu. Uzajaman položaj His ostataka u nativnom TT molekulu je takav da omogućava vezivanje polivalentnih katjona što ukazuje da bi hromatografska metoda zasnovana na interakcijama sa imobilizovanim metalnim jonima (imobilisani metal – afinitetna hromatografija (IMAC)) mogla biti efikasan pristup prečišćavanju TT-a⁵².

IMAC se zasniva na specifičnim interakcijama između imobilizovanih metalnih jona i određenih amino kiselinskih ostataka na površini proteina (uglavnom His i nešto manje Cys i Trp). Jačina interakcija sa imobilizovanim jonima zavisi od tipa, broja i distribucije amino kiselinskih ostataka na površini proteina, kao i od prirode imobilizovanog metalnog jona. Najčešće korišćeni metalni joni su Ni²⁺, Cu²⁺ i Zn²⁺. Čak i jedan His na površini proteina može da dovede do adsorpcije proteina na matriks sa imobilizovanim Cu²⁺ jonima, dok su za adsorpciju na Zn²⁺ i Ni²⁺ potrebna dva vicinalna ostataka His. Prema brojnim literaturnim podacima Ni²⁺ se najčešće koristi za

prečišćavanje His-tag proteina. U nekim slučajevima mogu se uspešno koristiti i Fe^{3+} , Co^{2+} i Ca^{2+} joni⁶⁶.

2.2.3 Imunoterapija: preparat na bazi TT-specifičnih At

Uprkos postojanju efikasne vakcine, tetanus i dalje predstavlja zdravstveni problem u zemljama u razvoju (prvenstveno u Africi i Indiji)⁴. Globalna incidenca tetanusa, poslednjih deset godina, kreće se oko 50 000 ljudi godišnje³⁸. Takođe, povećana incidenca tetanusa beleži se i tokom elementarnih nepogoda (zemljotresi, cunami, uragani, itd), kada usled povećane incidence trauma dolazi i do povećane incidence infekcija sa *C. tetani*⁵. Iz tih razloga, pored preventivne vakcinacije, kontinuirano se radi se na razvijanju novih terapijskih pristupa.

Brojene studije pokazuju da TT-specifična antitela imaju ključnu ulogu u zaštiti od intoksikaciji TT-om i da stepen zaštite direktno korelira sa koncentracijom TT-specifičnih antitela u serumu. Samim tim, kada postoji sumnja na TT intoksikaciju kod neimunizovanih i nedovoljno zaštićenih osoba, preporučuje se imunoterapija koja podrazumeva aplikaciju TT-specifičnih antitela sposobnih da neutrališu slobodno cirkulišući TT. Preparati na bazi TT-specifičnih At primenjuju se samostalno ili u kombinaciji sa drugim merama intezivne nege.

2.2.3.1 TT-specifični preparati bazirani na poliklonalnim antitelima u terapiji tetanusa

Antitela su efektorski molekuli humoralnog imunskog odgovora. U sklopu imunskog odgovora na stimulaciju antigenom dolazi do aktivacije B limfocita i njihove diferencijacije u plazma ćelije, ćelije koja ima sposobnost sekrecije specifičnih antitela. Antitela koja sekretuje jedna plazma ćelija su identičnih karakteristika. Međutim, antitela sekretovana od strane većeg broja plazma ćelija diferenciranih u sklopu imunskog odgovora na određeni antigen mogu se međusobno razlikovati po (pod)klasi, finoj epitopskoj specifičnosti i/ili afinitetu za antigen⁵⁵. Antitela koja se sekretuju u

sklopu imunskog odgovora na specifičnu stimulaciju antigenom označavaju se kao antigen-specifična poliklonska antitela (PAt). Osnovni izvor za izolovanje specifičnih PAt je serum imunizovanih jedinki gde je koncentracija antigen-specifičnih antitela najčešće u opsegu od 50 do 200 $\mu\text{g/mL}$ ¹⁰.

Preporuka WHO je da se u humanoj populaciji koriste antitetanusni preparati bazirani na PAt izolovanim iz plazme zdravih dobrovoljnih davalaca krvi specifično imunizovani TTd-om (engl. *tetanus immunoglobulins*, TIG) ili polivalentni imunoglobulini za intravensku primenu (engl. *intravenous immunoglobulins*, IVIG).⁶

Ukoliko nisu dostupni preparati na bazi humanih imunoglobulina, za pasivnu imunizaciju pacijenata se mogu koristiti i heterologi, životinjski antitetanusni serumi. Najčešće se koriste TT-vezujući fragmenti (F(ab)₂) poliklonskih antitela dobijenih iz seruma konja imunizovanih TTd-om.

Sama proizvodnja preparata na bazi poliklonskih antitela je relativno jeftina i nije tehnički zahtevna, ali je dugotrajna i količine koje se mogu proizvesti u kratkom vremenskom intervalu su ograničene. Takođe, faktori koji otežavaju široku primenu preparata na bazi PAt, i humanog i animalnog porekla, su: varijacije u jedinačnoj efikasnosti kao posledica individualnog odgovora na specifičnu imunizaciju, i neophodnost intenzivne i mikrobiološke kontrole u cilju smanjenja rizika od infekcije krvno-prenosivim patogenima (npr. HIV, hepatitis, različite zoonoze). Pored toga, u odnosu na primenu TIG i IVIG, pri primeni preparata animalnog porekla veća je verovatnoća pojave neželjenih reakcija primaoca.⁹

Uzimajući u obzir sve pomenute poteškoće jasno je da postoji potreba za visoko specifičnim anti-TTd/TT antitelima koja se lako mogu proizvesti u velikim količinama *in vitro*.

2.2.3.2 Primena preparata baziranih na monoklonskim antitelima u terapiji tetanusa

Već duži niz godina, anti-TTd/TT MAt se razmatraju kao alternativa antitetanusnim serumima¹⁰. Generalno, preparati na bazi MAt su homogeni, konzistentnog sastava i specifičnosti, i, ukoliko postoji stabilan izvor MAt, mogu se

proizvoditi u neograničenoj količini^{11,12,18}. Ujedno, značajan napredak koji je ostvaren u dizajniranju hranljivih podloga za kultivaciju hibridomskih ćelija (*serum free* medijumi sa smanjenom mogućnošću unakrsne kontaminacije) rezultovao je dobijanjem preparata visoke čistoće i većih prinosa MAt^{67,68}.

Proizvodnja MAt je inicijalno zahtevnija jer je potrebno dobiti stabilan i efikasan izvor antitela. Međutim, kada se dobije stabilan izvor MAt, njihova proizvodnja je daleko efikasnija u poređenju sa proizvodnjom PAt.

Hibridomska tehnologija je najstariji pristup za dobijanje MAt. Za definisanje ovog postupka *Köhler* i *Milstein* su 1984. godine dobili Nobelovu nagradu. Hibridomska tehnologija se zasniva na fuziji mijelomskih ćelija sa B limfocitima jedinice imunizovane antigenom od interesa. Na ovaj način se dobija hibridom, hibridna ćelija koja "nasleđuje" od B ćelije sposobnost sekrecije antitela a od mijelomske ćelije sposobnost deobe i rasta u ćelijskoj kulturi. MAt sekretovana od strane jednog B ćelijskog klona imaju istu finu epitopsku specifičnost i prepoznaju antigen sa istim afinitetom.⁵⁵

Jedna od glavnih prepreka u formulisanju TT-specifičnog preparata na bazi MAt je selekcija MAt koji može pružiti zaštitu pri intoksikaciji TT-om. Više istraživačkih grupa je pokazalo da činjenica da određeno antitelo interaguje sa TT-om ne znači nužno da to antitelo ima zaštitni potencijal.^{13,15-17} Smatra se da je za prevenciju tetanusa ključno sprečavanje vezivanja TT za neuron⁶⁹. Međutim, pokazano je da određena antitela koja interaguju sa epitopima TT-a lociranim u regionu kojim se TT vezuje za neuron (C-terminalni deo Hc) nisu protektivna, dok su određena antitela specifična za epitope Lc TT-a sprečavala razvoj tetanusa^{13,14,70}. S obzirom da je *in vivo* ispitivanje zaštitnog potencijala svakog pojedinačnog MAt zahtevan i dugotrajan postupak koji sa sobom nosi i određene etičke probleme, bilo bi od velikog značaja da se definišu parametri koji se mogu odrediti *in vitro* i na osnovu kojih je moguće predvideti zaštitni potencijal anti-TTd/TT MAt. Mogućnost selekcije MAt sa zaštitnim potencijalom na osnovu *in vitro* parametara značajano bi ubrzalo proces formulisanja efikasnih TT-specifičnih preparata i smanjilo potrebu za ispitivanjima na životinjama.

Definisana fina epitopska specifičnost MAt u smislu karakterizacije preparata predstavlja prednost u odnosu na PAt, ali ona može predstavljati i ograničenje. Naime, male promene u strukturi ciljnog epitopa (glikozilacija, izmene u primarnoj strukturi,

konformacione promene) mogu dovesti do nemogućnosti prepoznavanja datog antigena od strane specifičnog MAt.¹⁸ Pored toga, u određenim slučajevima postizanje punog zaštitnog efekta zahteva istovremeno maskiranje više epitopa na jednom antigenu. Konačno, opsonizacija antigena je efikasnija kada se više antitela simultano veže za antigen što rezultuje efikasnijom eliminacijom antigena¹⁹⁻²¹. Stoga se u velikom broju slučajeva formulisanje specifičnih oligoklonskih preparata smatra optimalnim pristupom.

U cilju prevazilaženja navedenih problema velika pažnja se poklanja dizajniranju terapeutika koji sadrže veći broj MAt specifičnih za različite epitope istog antigena. Oligoklonski preparati na bazi MAt su manje osetljivi na promene u strukturi antigena u poređenju sa preparatima na bazi jednog MAt, a moguće ih je, sa nepromenljivim karakteristikama, proizvesti u velikoj količini što im daje prednost u odnosu na preparate na bazi PAt^{11,12}. Prednosti upotrebe definisanih oligoklonskih preparata umesto preparata sa jednim MAt pokazane su u tretmanima infekcija bakterijom *Clostridium botulinum*^{23,24} i *Bacillus anthracis*²⁷. Takođe, određena istraživanja su ukazala da bi TT-specifični oligoklonski preparati mogli biti efikasniji i u slučaju tetanusa^{16,17}.

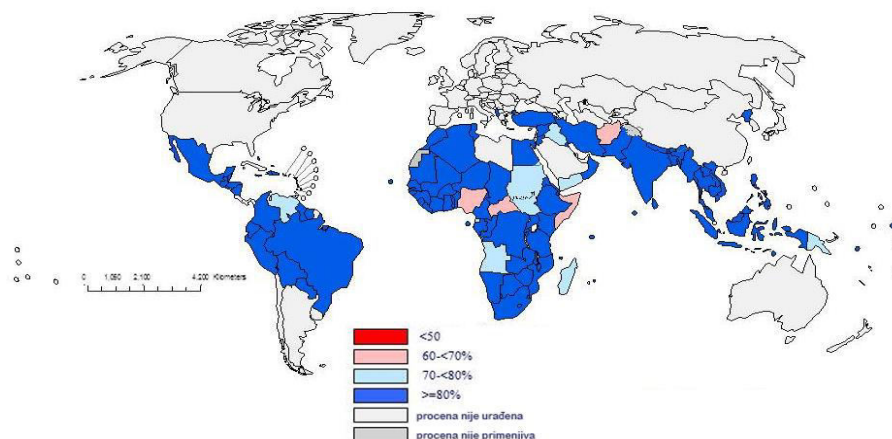
2.3 Heterologi efekti vakcinacije protiv tetanusa

Nedvosmisleno je pokazano da specifična imunizacija predstavlja najbolji vid zaštite od različitih infekcija, ali je sve više podataka koji ukazuju i na heterologe efekte imunizacije²⁸⁻³⁴. Naime, na više primera je pokazano da imunizacija rađena sa ciljem uspostavljanja zaštitnog imunskog odgovora protiv specifičnog patogena rezultuje i tzv. heterologom imunosti tj. imunskim odgovorom koji je usmeren ka drugom nesrodnom (heterologom) patogenu. Mehanizmi koji su u osnovi uspostavljanja heterologe imunosti nisu dovoljno proučeni ali se predpostavlja da se bar delimično zasnivaju na ukrštenoj reaktivnosti antitela. Ukrštena reaktivnost antitela podrazumeva sposobnost antitela da pored antigena protiv koga je inicijalno sekretovano (primarni antigen) interaguje i sa heterologim antigenom koji je poseduje određeni stepen strukturne sličnosti sa primarnim antigenom.

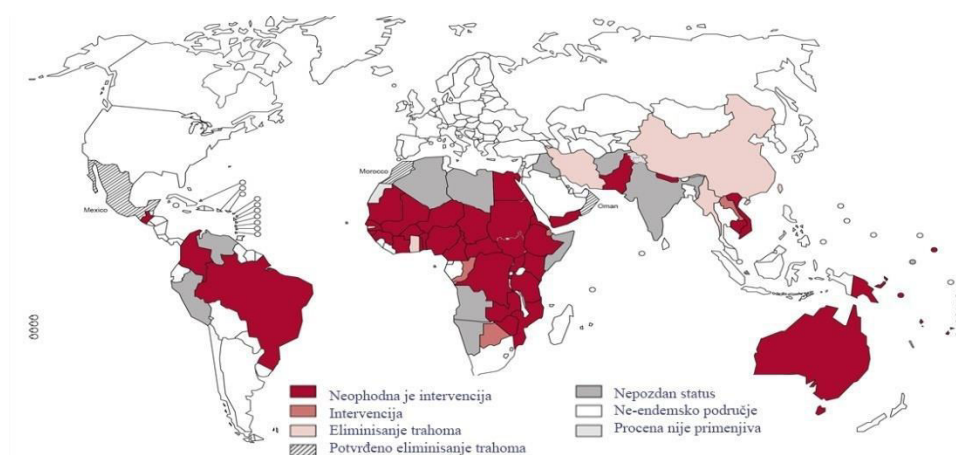
Radovi više istraživačkih grupa, direktno ili indirektno, ukazuju na strukturnu homologiju TT i drugih heterologih proteina što ostavlja mogućnost da ti proteini budu prepoznati od strane antitela čija je produkcija pokrenuta imunizacijom TTd-om³⁵.

U okviru studije o heterologim efektima vakcine protiv tetanusa, difterije i pertusisa (DTPer vakcina) pokazano je da kod zdrave dece starosti do 2 godine, nakon *booster* doze DTPer vakcine dolazi do povećanja nivoa antitela specifičnih za hlamidijalne antigene (*Chlamydia pneumoniae*).³⁷ Takođe, pri obradi rezultata seroloških analiza uzoraka pacijenata rađenih u cilju merenja antitela specifičnih za hlamidijalne antigene uočeno je da je nivo antitela specifičnih za antigene hlamidije znatno veći kod osoba koje su imunizovane, između ostalog i TTd-om, u poređenju sa osobama koje nisu imunizovane³⁶. Ovi podaci ukazuju na mogućnost postojanja strukturne homologije TTd/TT i hlamidijalnih antigena. Navedena pretpostavka, zajedno sa činjenicom da drastičan pad incidence trahoma u razvijenom svetu koincidira sa omasovljenjem vakcinacije usled definisanja nacionalnih programa o obaveznoj vakcinaciji polovinom XX veka (**Slika 2.4**), daju osnov za razmatranje uloge heterologe imunosti pokrenute imunizacijom TTd-om u otpornosti prema (okularnim) hlamidijalnim infekcijama.

A)



B)



Slika 2.4. Uporedni prikaz globalne distribucije vakcinacije protiv tetanusa tokom 2016. godine (A) i incidence trahoma tokom 2017. godine (B). Prema podacima dobijenim iz 194 zemlje članice WHO kreirane su mape pomoću Global Health Observatory Maps, WHO/UNICEF: A) Vakcinacija novorođenčadi protiv tetanusa tokom 2016. godine (na mapi su označene zemlje gde je vakcinacija dece: > 50% (■); od 60% do 70% (■); ≥80% (■). Zemlje u kojim zbog redovnog sistemskog sprovođenja vakcinacije nije rađena provera (■). Podaci su preuzeti sa:

http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/global_pab_neonatal_tetanus_coverage_2016.jpg

B) Globalna incidenca trahoma (na mapi su označene zemlje u kojima je: neophodna medicinska pomoć i hirurška intervencija u suzbijanju trahoma (■); potreba medicinska pomoć (■); eliminisanje trahom (■); potvrđeno eliminisanje trahom (▨); nepouzdan status (■). Ne-endemsko područje (■). Podaci su preuzeti sa:

http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Trachoma_2017.png.

Naime, do sredine XX veka incidenca trahoma je bila epidemijskih razmera^{71,72}. Od polovine XX veka trahom se javlja samo endemski, u nerazvijenim delovima Afrike, Azije, Australije (Slika 2.4B). Drastičnom smanjenju incidence trahoma u danas razvijenim delovima sveta sigurno su doprineli i poboljšanje životnog standarda,

upotreba antibiotika, bolji higijenski uslovi i zdravstvena nega, ali potencijalni doprinos heterologe imunosti ne može biti zanemaren⁷¹.

U prilog pretpostavci da bi unakrsno reaktivna antitela generisana nakon imunizacije TTd-om mogla doprineti otpornosti ka hlamidijalnim infekcijama idu i saznanja o imunskim mehanizmima koji su u osnovi kontrole / sprečavanja hlamidijalnih infekcija. Uspostavljanje specifičnog imunskog odgovora dominantno Th1 tipa je ključno za kontrolu / sprečavanje hlamidijalnih infekcija, ali i značaj antitela, prvenstveno na mestu infekcije, nije zanemarljiv⁷³⁻⁷⁷.

Bakterije roda *Chlamydia* su intracelularne bakterije za koje je karakterističan bifazni životni ciklus. U formi elementarnog tela (ET; engl. *elementary body*) koje je infektivno i metabolički neaktivno *Chlamydia trachomatis* (Ct) inficira ćeliju domaćina. Potom se transformiše u neinfektivno, metabolički aktivno retikularno telo (RT; engl. *reticulate body*) koje se u ćeliji domaćina replicira. Nakon umnožavanja RT se transformiše u ET i nakon lize ćelije domaćina dospeva u tkivni međucelijski prostor, spremno da započne novi infektivni ciklus⁷⁸. Pokazano je da neutrališuća antitela specifična za hlamidijalne protein eksprimirane na površini ET⁷⁹⁻⁸² imaju veoma važnu ulogu u sprečavanju inicijalnog kontakta hlamidijalnih ET i ćelije domaćina, a time i sprečavanju širenja hlamidijalne infekcije^{73,80,83,84}. Značaj At koja prepoznaju hlamidijalne proteine takođe je pokazan i brojnim studijama dizajniranja vakcina protiv hlamidijalnih infekcija^{81,82,85,86}.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je da se, kroz ispitivanje vezivnih karakteristika panela TT / TTd-specifičnih MAt i njihovog zaštitnog potencijala *in vivo*, utvrdi na koji način i u kojoj meri vezivne karakteristike TTd/ TT specifičnih antitela određuju njihovu sposobnost da spreče intoksikaciju TT-om i / ili doprinesu otpornosti ka heterologim infekcijama.

Kako bi se ostvario ovaj cilj planirano je da se eksperimentalni deo realizuje u 3 faze čiji su pojedinačni ciljevi:

- Definisanje ključnih vezivnih karakteristika TTd/TT-specifičnih MAt koja mogu *in vivo* da obezbede zaštitu od intoksikacije TT-om.

U okviru ove faze planirano je da se *in vitro* okarakteriše vezivanje seta TTd/TT-specifičnih MAt za TT sa aspekta epitopske specifičnosti kao i afiniteta i brzine uspostavljanja interakcija, da se ispita njihov zaštitni potencijal *in vivo* i da se korelacionom analizom definišu relevantne karakteristike anti-TTd/TT MAt – TT interakcije na osnovu kojih se može predvideti njihov *in vivo* zaštitni potencijal.

- Ispitivanje uzajamnog uticaja anti-TTd/TT MAt pri istovremenom vezivanju za TT i njegovog značaja u poboljšanju zaštitnog potencijala biklonalnih ekvimolarnih preparata na bazi anti-TTd/TT MAt u odnosu na odgovarajuća pojedinačna anti-TTd/TT MAt.

U okviru ove faze planirano je da se *in vitro* okarakteriše vezivanje biklonalnih ekvimolarnih preparata (BEP) na bazi anti-TTd/TT MAt za TT i utvrdi *in vivo* njihov zaštitni potencijal. Nakon korelacione analize ovih podataka i njihovog poređenja sa

rezultatima dobijenim za anti-TTd/TT MAt koji ulaze u sastav BEP, trebalo bi da se stekne uvid da li postoji uzajaman uticaj anti-TTd/TT MAt pri istovremenom vezivanju za TT i na koji način on utiče na zaštitni potencijal BEP.

- Ispitivanje uloge heterologe imunosti uspostavljene nakon imunizacije TTd-om u otpornosti ka okularnim hlamidijalnim infekcijama

U okviru ove faze planirano je da se, koristeći set anti-TTd/TT MAt, utvrdi da li postoji unakrsna reaktivnost TT/TTd-specifičnih At sa hlamidijalnim antigenima i da se u relevantnim *in vitro* i *in vivo* modelima utvrdi njen funkcionalni značaj.

4. NAŠI RADOVI

U istraživanjima koja su realizovana u sklopu izrade ove doktorske disertacije korišćeno je osam anti-TTd/TT MAt dobijenih hibridomskom tehnologijom. Selektovana MAt, interno obeležena kao MAt26, MAt33, MAt39, MAt41, MAt42, MAt51, MAt62 i MAt71, izolovana su hromatografijom na protein G koloni iz supernatanta kultura odgovarajućih hibridoma gajenih u *Integra Cell Line* bocama. U poglavlju 8. Prilozi (**Slika 8.1 - Slika 8.2**) prikazani su podaci koji se odnose na prečišćavanje selektovanih MAt i potvrdu očuvanosti njihovih vezivnih karakteristika nakon primenjenog postupka prečišćavanja (**Slika 8.3**).

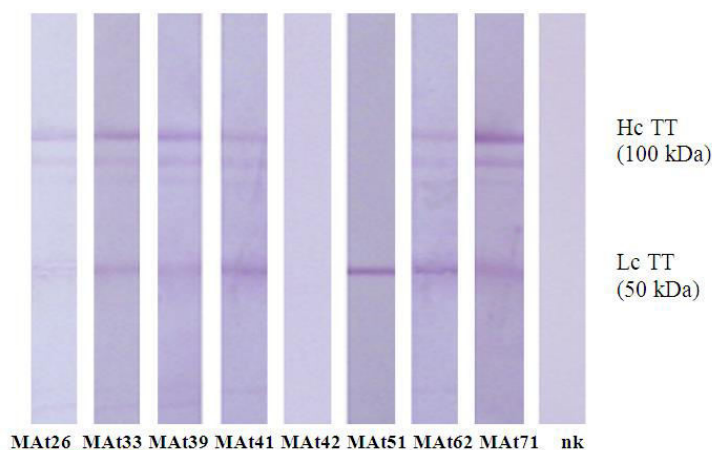
TT i TTd koji su korišćeni za ispitivanje vezivnih karakteristika anti-TTd/TT MAt dobijeni su prečišćavanjem iz rastvora tzv. nativnog TT i nativnog TTd koji se dobijaju tokom standardnog proizvodnog postupka vakcine protiv tetanusa u Institutu za virusologiju, vakcine i serume – Torlak, Beograd. TT i TTd su prečišćeni hidrofobnom hromatografijom na *HiTrap™ Phenyl Sepharose* koloni. U poglavlju 8. Prilozi (**Slika 8.4 - Slika 8.7**) prikazani su podaci koji se odnose na karakteristike polaznih rastvora i prečišćenih TTd preparata (**Tabela 8.1 – Tabela 8.2**) i TT preparata (**Tabela 8.3**), kao i sam postupak prečišćavanja i potvrda očuvanosti funkcionalnih karakteristika nakon primenjenog postupka prečišćavanja (**Slika 8.4 - Slika 8.5**)⁶¹.

4.1 Ispitivanje vezivnih karakteristika anti-TTd/TT MA_t

4.1.1 Lokalizacija epitopa selektovanih anti-TTd/TT MA_t

Prvi korak u istraživanju bio je lociranje epitopa u molekulu TT-a koje prepoznaju selektovana MA_t.

Western blot analizom rađenom nakon SDS-elektroforeze na 9% poliakrilamidnom gelu (PAAG) u redukujućim uslovima, pokazano je da sva odabrana MA_t, osim MA_t42, imaju sposobnost vezivanja za delove primarne sekvence TT-a. MA_t26, MA_t33, MA_t39, MA_t41, MA_t62 i MA_t71 su interagovala sa linearnim epitetopima lociranim i na Hc i na Lc TT-a (**Slika 4.1**), dok je MA_t51 interagovao isključivo sa Lc.



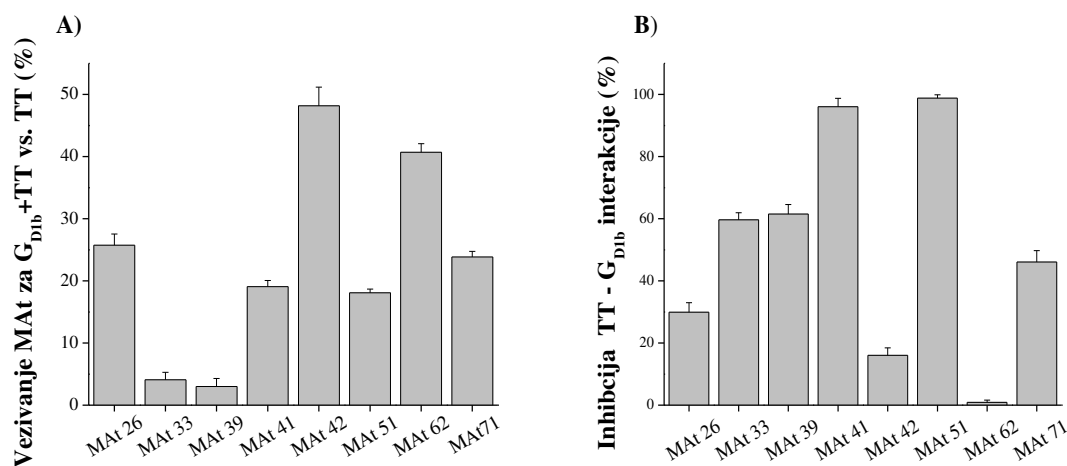
Slika 4.1. *Western blot* analiza reaktivnosti MA_t26, MA_t33, MA_t39, MA_t 41, MA_t42, MA_t51, MA_t62 i MA_t71 ka teškom i lakom lancu TT molekula. TT je nakon redukcione SDS-PAGE (9% PAAG, Mini Protean II System, Bio-Rad) transferovan na polivinil difluoroidnu membranu. Za vizuelizaciju interakcije MA_t-B (monoklonsko antitelo obeleženo biotinom) i TT-a korišćen je sistem extrAvidin-alkalna fosfataza//NBT/BCIP. Membrana na koju je transferovan TT tretirana sa extrAvidin-alkalna fosfataza//NBT/BCIP predstavlja negativnu kontrolu (nk).

Takođe, *Western blot* analiza je ukazala da MA_t41 i MA_t62 vezuju Hc i Lc sličnim intezitetom, dok je vezivanje MA_t26, MA_t33, MA_t39 i MA_t71 bilo intenzivnije za Hc nego za Lc. Pokazano je da se MA_t51 vezuje samo za Lc.

Dalja istraživanja su bila usmerena na određivanje lokacije specifičnog epitopa selektovanih MAt u odnosu na gangliozid-vezujuće mesto TT. Dosadašnja istraživanja pokazuju da su za prevenciju intoksikacije TT-om ključna TT-specifična neutralizujuća antitela⁸⁷, sposobna da spreče prvi korak intoksikacije tj. vezivanje TT za neuron. Za inicijalno vezivanje TT-a za neurone izuzetno je značajno uspostavljanje interakcije sa gangliozidima na površini ćelije. U skladu sa tim su i rezultati nekoliko istraživanja u kojima je pokazano da su MAt koja se vezuju za gangliozid-vezujuće mesto TT-a efikasna u zaštiti od tetanusa^{70,88}. Ova MAt protektivni efekat ostvaruju maskiranjem gangliozid-vezujućeg mesta na TT i na taj način blokiraju vezivanje TT za membranu neurona i njegov ulazak u neuron. TT prvenstveno interaguje sa gangliozidima iz serija G_{D1a}, G_{D1b}, G_{Q1b} i G_{T1b}, a nešto slabije sa gangliozidima iz serije G_{M1}⁴⁹.

U cilju određivanja pozicije epitopa selektovanih MAt u odnosu na gangliozid vezujuće mesto TT-a, najpre je ELISA testom (*enzyme linked immunoadsorbent assay*) ispitana sposobnost vezivanja selektovanih MAt za TT-G_{D1b} kompleks. Polazna pretpostavka je bila da će u slučaju MAt čiji je epitop lociran u okviru gangliozid-vezujućeg mesta ili u njenoj neposrednoj blizini biti smanjeno vezivanje za TT-G_{D1b} kompleks u poređenju sa vezivanjem za istu količinu TT-a direktno adsorbovanog na ELISA ploču. Preliminarnim eksperimentima je pokazano da selektovana MAt ne interaguje sa G_{D1b}. Na **Slici 4.2A** su predstavljeni procenti specifičnog vezivanja MAt za TT koji je prethodno kompleksiran sa G_{D1b} u odnosu na vezivanja MAt za istu količinu TT direktno adsorbovanu na mikrotitar ploču (100% vezivanje).

U sledećem koraku ispitana je sposobnost selektovanih MAt da inhibiraju uspostavljanje TT-G_{D1b} interakcije. Na **Slici 4.2B** predstavljeni su procenti vezanog TT za G_{D1b} nakon jednočasovne inkubacije sa specifičnim MAt. Vezivanje TT inkubiranog pod istim uslovima bez MAt je bilo referentno (100% vezivanje).



Slika 4.2. Sposobnost vezivanja anti-TTd/TT-MAT za TT/ G_{D1b} kompleks i njihov potencijal da inhibiraju TT - G_{D1b} interakciju. A) Procenat vezivanja selektovanih MAT za TT prethodno adsorbovan na gangliozid G_{D1b} u odnosu na vezivanje selektovanih MAT za istu koncentraciju TT direktno adsorbovanog na mikrotitar ploču (100% vezivanje). B) Procenat vezivanja TT za G_{D1b} nakon inkubacije (1h/RT) sa selektovanim MAT (vezivanje TT za G_{D1b} bez prethodne inkubacije sa MAT predstavlja 100% vezivanja). Uzorci su analizirani u triplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška.

Dobijeni rezultati pokazuju da MAAt42 i MAAt62 najslabije utiču na formiranje TT- G_{D1b} kompleksa, dok je formiranjem TT- G_{D1b} kompleksa vezivanje MAAt33 i MAAt39 za TT skoro potpuno smanjeno (smanjenje ~95% u odnosu na vezivanje za TT). Sa druge strane, pokazano je da preinkubacija MAAt41 i MAAt51 sa TT-om u potpunosti inhibira vezivanja TT za G_{D1b}, dok MAAt42 i MAAt62 ne inhibiraju TT-G_{D1b} interakciju. *Pearson*-ovom bivarijantnom korelacionom analizom je pokazano da između sposobnosti selektovanih MAT da spreče vezivanje TT za G_{D1b} i njihovog vezivanja za TT-G_{D1b} kompleks postoji značajna negativna korelacija (*Pearson*-ov korelacioni koeficijent (P_{cc}) = -0,679, statistička značajnost (P) = 0,035).

Analiza vezivanja odabranih MAT za TT adsorbovan na G_{D1b} ukazuje da se ciljni epitopi MAAt33 i MAAt39 nalaze u neposrednoj blizini gangliozid-vezujućeg mesta, za razliku od epitopa MAAt42 i MAAt62 koji su udaljeni od gangliozid-vezujućeg mesta TT molekula. Formiranje G_{D1b}-TT kompleksa dovodi do sternih smetnji u vezivanju MAAt26, MAAt41, MAAt51 i MAAt71, ali su one manje izražene nego kod MAAt33 i MAAt39. Ako se uzmu u razmatranje samo sterni faktori, ukupna inhibicija TT- G_{D1b} interakcije nakon preinkubiranja TT sa MAAt41 i MAAt51 je naizgled kontradiktorna njihovom vezivanju za TT-G_{D1b} kompleks adsorbovan na mikrotitar ploču. Međutim, u slučaju vezivanja MAT za TT-G_{D1b} kompleks treba uzeti u obzir i mogućnost konformacionih

promena u TT molekulu koje mogu dovesti do stvaranja novih epitopa tzv. neo-epitopa^{89,90}. Takođe, vezivanjem TT za G_{D1b} preko jednog od dva gangliozid-vezujuća mesta⁹¹ može ostati dovoljno prostora za vezivanje MAt41 ili MAt51. Sa druge strane, u slučaju vezivanja MAt-TT tokom preinkubacije uočena inhibicija formiranja TT- G_{D1b} kompleksa može biti suma sternih smetnji i promene u 3D strukturi gangliozid-vezujućeg mesta zbog vezivanja MAt¹⁶.

4.1.2 Određivanje konstante afiniteta i brzine uspostavljanja interakcije selektovanih anti-TTd/TT MAt ka TT molekulu

Određivanje konstante afiniteta (K_a) rađeno je kompetitivnom ELISA-om zasnovanom na inhibiciji vezivanja MAt za TT adsorbovan na mikrotitar ploči pomoću TT-a u rastvoru. Da bi određivanje K_a bilo validno morali su biti ispunjeni su sledeći uslovi:

- da ukupna koncentracija MAt bude bliska ili manja od vrednosti konstante afiniteta;
- da apsorbancija koja se meri u poslednjem koraku ELISA-e bude proporcionalna koncentraciji vezanog MAt za TT adsorbovan na mikrotitar ploči;
- da temperatura bude konstantna tokom eksperimenta.

K_a vrednosti selektovanih MAt za TT određene *Scatchard*-ovom analizom modifikovanoj prema *Stevens*-u⁹² i predstavljene su u **Tabeli 4.1**.

Tabela 4.1. Afiniteti (K_a) i konstante brzine asocijacije (k_{on}) MAt ka tetanus toksinu

	$K_a^{a,b}$		k_{on}^b	
	($\times 10^8 M^{-1}$)	R^2	($\times 10^3 M^{-1}s^{-1}$)	R^2
MAt26	$0,4 \pm 0,2$	$> 0,91$	$1,1 \pm 0,2$	$> 0,96$
MAt33	$3,7 \pm 0,2$	$> 0,95$	$118,0 \pm 8,1$	$> 0,98$
MAt39	$0,9 \pm 0,1$	$> 0,96$	$47,8 \pm 0,8$	$> 0,97$
MAt41	$0,7 \pm 0,1$	$> 0,93$	$46,3 \pm 1,1$	$> 0,96$
MAt42	$2,1 \pm 0,5$	$> 0,94$	$55,6 \pm 0,9$	$> 0,96$
MAt51	$2,4 \pm 0,4$	$> 0,95$	$185,1 \pm 16,1$	$> 0,96$
MAt62	$1,9 \pm 0,4$	$> 0,96$	$20,7 \pm 0,8$	$> 0,97$
MAt71	$1,8 \pm 0,6$	$> 0,94$	$17,1 \pm 0,5$	$> 0,98$

^a K_a izračunate Scatchard-ovom metodom modifikovanoj prema Stevens-u

^b Srednja vrednost (tri nezavisna merenja) \pm standardna greška.

Na osnovu određenih K_a vrednosti može se zaključiti da afiniteti selektovanih MAt ka TT prati sledeći niz MAt33 > MAt51 \approx MAt42 > MAt62 \approx MAt71 > MAt39 \approx MAt41 > MAt26.

Osim stabilnosti kompleksa MAt-TT, koja se ogleda u vrednosti K_a , sama brzina formiranja kompleksa takođe može biti važan faktor koji utiče na zaštitni potencijal MAt⁹³. Određene vrednosti konstante asocijacije (k_{on}) pokazuju da se MAt33 ($k_{on}(MAt33)=1,18 \pm 0,08 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$) i MAt51 ($k_{on}(MAt51)=1,85 \pm 0,16 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$) vezuju za TT značano brže ($P < 0,05$) nego ostala MAt (**Tabela 4.1**).

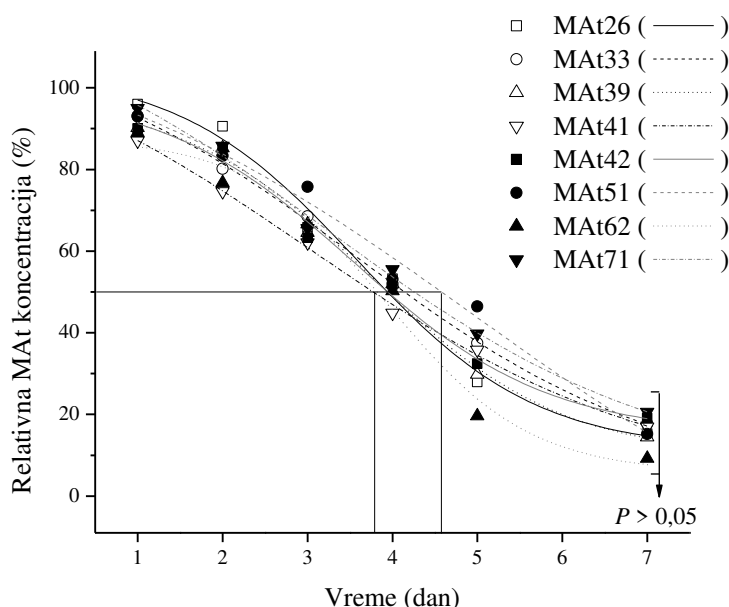
Nije uočena statistički značajna korelacija između afiniteta selektovanih MAt i njihove sposobnosti da inhibiraju vezivanje TT-a za G_{D1b} ($P_{cc} = -0,007$, $P = 0,988$) i da interaguju sa kompleksom G_{D1b} -TT ($P_{cc} = -0,086$, $P = 0,839$). Takođe, sposobnosti MAt da inhibiraju vezivanje TT-a za G_{D1b} ($P_{cc} = 0,586$, $P = 0,127$) i da interaguju sa kompleksom G_{D1b} -TT ($P_{cc} = -0,468$, $P = 0,243$) nije značajno korelirala ni sa određenim k_{on} vrednostima.

4.1.3 Zaštitni potencijal selektovanih anti-TTd/TT MAt

Iako sva selektovana MAt pripadaju IgG1 podklasi⁹⁴ male razlike u njihovoj proteinskoj sekvenci i eventualne razlike u glikozilaciji^{95,96} mogu uticati na njihov efektorski potencijal kao i dužinu poluživota ($t_{1/2}$) u serumu⁹⁷⁻⁹⁹. Dužina poluživota u

cirkulaciji je važan farmakokinetički parametar jer direktno određuje vremenski zavisne promene efektivne koncentracije terapeutika⁹⁸.

Za selektovana MAt određivano je $t_{1/2}$ u cirkulaciji kako bi se utvrdilo da li / u kojoj meri eventualne razlike u $t_{1/2}$ utiču na njihov zaštitni potencijal. S obzirom da u serumima sakupljenim neposredno pre aplikovanja MAt nije detektovana reaktivnosti serumskog IgG ka TT, pretpostavljeno je da ukupna reaktivnost IgG ka TT potiče od i.v. injektovanih MAt. Najveće vezivanje serumskog IgG za TT je izmereno u serumima sakupljenim 8h nakon intravenske (i.v.) aplikacije MAt i ono je uzeto kao referentno (100% vezivanje), proporcionalno maksimalnoj koncentraciji MAt u serumu (Slika 4.3).



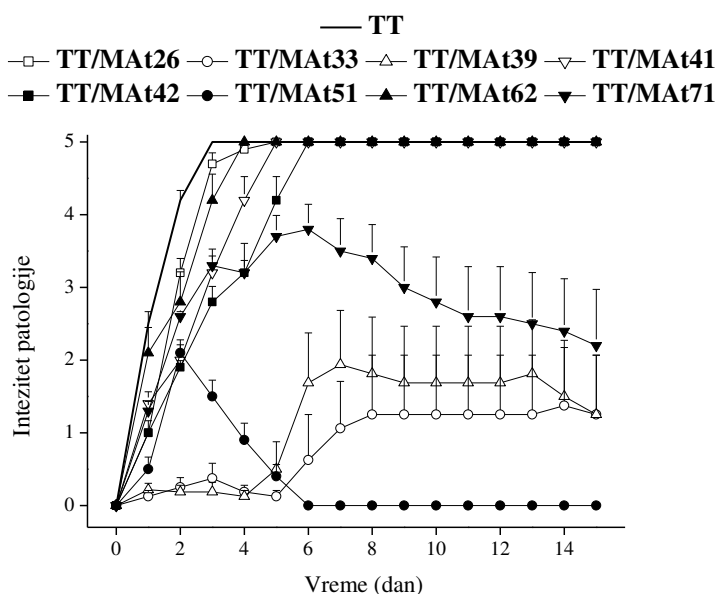
Slika 4.3. Vremenski zavisne promene vrednosti relativnih koncentracija TT-specifičnih MAt u serumu miševa. Miševi (5 miševa po grupi) i.v. su tretirani odgovarajućim MAt (50 μ g/miš). S obzirom da je reaktivnost IgG ka TT u serumima miševa sakupljenih pre tretmana zanemarljiva, reaktivnost ka TT-u IgG-a iz seruma sakupljenih nakon tretmana potiče od aplikovanih MAt. Vezivanje ubrizganih MAt za TT adsorbovan na mikrotitar ploču u definisanim vremenskim intervalima određena je za svaki pojedinačni serum. Za svakog miša, vezivanje MAt iz seruma sakupljenog 8h nakon tretmana proporcionalno je maksimalnoj koncentraciji MAt u serumu (100%). Vezivanje MAt u narednim sakupljenim serumima proporcionalno je relativnoj koncentraciji MAt (predstavljena kao procenat maksimalne koncentracije) u serumu. Na slici su predstavljene srednje vrednosti relativne koncentracije MAt u definisanim vremenskim intervalima (standardna greška < 10 %) i odgovarajuće krive dobijene sigmoidnim dozno-zavisnim fitovanjem ($R > 0,96$). Statistička značajnost između krivi određena je uporednim t-testom.

Sigmoidnim dozno-zavisnim fitovanjem dobijenih rezultata ($R > 0,96$) pokazano je da ~ 4. dana nakon aplikovanja koncentracija svih selektovanih MAt biva smanjena za polovinu. Međusobnim poređenjem procenata vezivanja MAt u određenim

vremenskim intervalima *Student*-ovim t-testom pokazano je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,01$) u dinamici uklanjanja selektovanih MAt iz cirkulacije. Ovaj rezultat je ukazao da eventualne razlike u zaštitnom potencijalu selektovanih MAt ne mogu biti posledica dinamike njihovog uklanjanja iz cirkulacije.

Protektivni potencijal selektovanih osam mišjih MAt ispitan je *in vivo* u miševima soja *Swiss white*. Promene u intezitetu patologije tetanusa nakon intraperitonealnog (i.p.) ubrizgavanja letalne doze TT preinkubirane sa odgovarajućim MAt su predstavljene na **Slici 4.4**. U **Tabeli 4.2** prikazani su stepen preživljavanja, intezitet patologije tetanusa i vreme oporavka miševa kojima je i.p. aplikovana letalna doza ($2LD_{50}$) TT-a preinkubiranog 1h sa MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71.

Pokazano je da MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71 imaju određeni protektivni kapacitet (**Slika 4.4.**), dok su MAt26, MAt41, MAt42, i MAt62 dovela samo do prolaznog ublažavanja kliničke slike u inicijalnoj fazi, ali nisu uspela da obezbede preživljavanje nakon intoksikacije letalnom dozom TT-a (**Slika 4.4.**). Naime, svi miševi tretirani TT-om preinkubiranim sa TT/MAt26, TT/MAt41, TT/MAt42 ili TT/MAt62 su uginule do 5. dana nakon tretmana.



Slika 4.4. Intezitet patologije miševa tretiranih letalnom dozom TT ili letalnom dozom TT prethodno inkubiranom sa anti-TTd/TT MAt. Miševima (10 miševa po grupi) je i.p. aplikovano TT ($2LD_{50}$) preinkubirane (1h/RT) sa MAt26, MAt33, MAt39, MAt41, MAt42, MAt51, MAt62 i MAt71 (MAt 10 μ g). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost inteziteta patologije \pm standardna greška određene je za svakog miša u grupi. Dan TT intoksikacije je označen kao 0. dan. Intezitet patologije tokom perioda nakon tretmana praćen je svakodnevno uzimajući u obzir (i) intezitet patologije miševa koji su bili živi u trenutku posmatranja; (ii) miševe koji su uginuli u trenutku posmatranja ili su eutanazirani prethodnog dana (ocene inteziteta patologije date su u odeljku 5.6. *In vivo* ispitivanja).

In vivo tretman letalnom dozom TT-a su preživeli svi miševi TT/MAt51 grupe (preživljavanje 100%), dok je stopa preživljavanja u grupama TT/MAt33 i TT/MAt39 bila 80%, a 60% u grupi TT/MAt71 (**Tabela 4.2**).

Tabela 4.2. Stepenn preživljavanja, maksimalan intezitet patologije tetanusa i vreme oporavka miševa kojima je i.p. aplikovano 2LD₅₀ TT preinkubiran 1h sa odgovarajućim MAt

MAt ^a	Stepenn preživljavanja (%)	Maksimalan intezitet patologije tetanusa ^b	Vreme oporavka ^c (dan)
MAt33	80	1,0 ± 0,7	2,9 ± 0,7
MAt39	80	1,9 ± 0,7	11,2 ± 1,7
MAt51	100	2,1 ± 0,2	5,5 ± 0,4
MAt71	60	2,9 ± 0,3	> 14,7

^a Ubrizgano je 10 µg MAt preinkubiranih sa 2LD₅₀ TT,

^b Miševi koji su bili živi u momentu posmatranja su uzeti u obzir prilikom određivanja inteziteta patologije,

^c Dan TT intoksikacije označen je kao 0.dan. Miševi su svakodnevno praćeni tokom 15 dana.

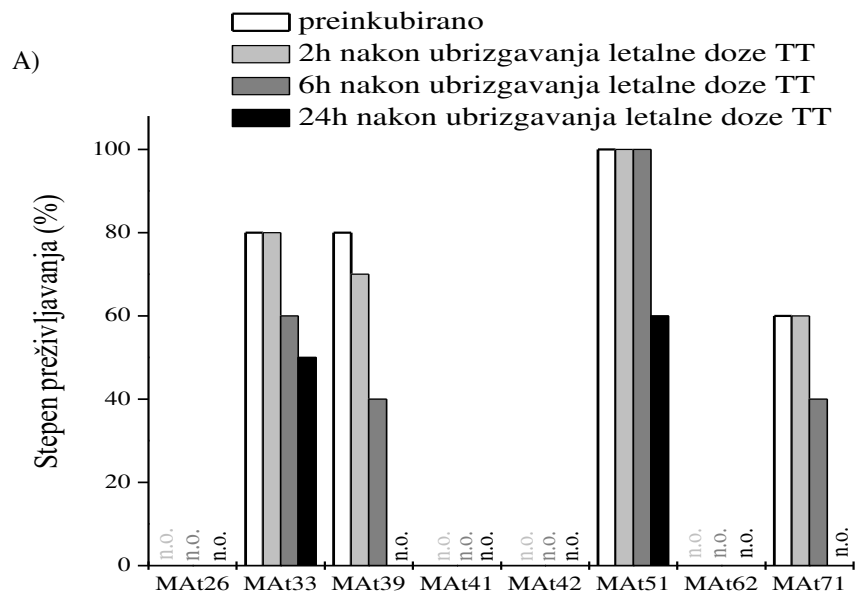
Uzimajući u obzir samo miševne koji su preživeli *in vivo* TT intoksikaciju (**Slika 4.4**), najlošija klinička slika je uočena kod TT/MAt71 tretiranih miševa (1. nedelja: $P < 0,0005$ vs. MAt33/TT i MAt39/TT grupa, $P < 0,05$ vs. MAt51/TT; 2. nedelja: $P < 0,005$ vs. MAt33/TT i MAt51/TT grupa, $P < 0,05$ vs. MAt39/TT). Osim toga, kod miševa tretiranih sa TT/MAt71 uočena je najlošija klinička slika $2,9 \pm 0,3$ i najduži period oporavka ($> 14,7$ dana). Tokom 2. nedelje nakon TT intoksikacije kliničke slike kod TT/MAt33- i TT/MAt51-tretiranih miševa su bile slične, dok je oporavak TT/MAt39-tretiranih miševa bio znatno sporiji ($P < 0,005$). Miševi u grupi TT/MAt33 i u grupi TT/MAt39 su se do kraja perioda praćenja potpuno oporavili (vreme oporavka za MAt33 je $2,9 \pm 0,7$ dana, a za MAt39 $11,2 \pm 1,7$ dana), dok su u grupi TT/MAt71 2 od 6 miševa i dalje imali blaže simptome tetanusa (**Tabela 4.2**).

Dobijeni rezultati ukazuju da je prema zaštitnom potencijalu MAt51 superiorno u odnosu na ostala selektovana MAt (**Slika 4.4**). U inicijalnoj fazi intoksikacije (prvih 5 dana nakon intoksikacije) klinička slika miševa TT/M51 grupe je bila nešto lošija u poređenju sa miševima grupe TT/MAt33 ($P = 0,039$), ali je stepenn preživljavanja u TT/MAt51 grupi bio 100% i svi miševi su se potpuno oporavili do 6. dana nakon intoksikacije letalnom dozom TT-a (**Tabela 4.2**). Dobijeni rezultati mogu da deluju

neočekivano s obzirom da se MAt51 specifično vezuje za Lc TT-a. Međutim, istraživanja Volk i saradnika¹⁷ pokazuju da epitopi za MAt koja mogu da obezbede zaštitu protiv tetanusa mogu da se nalaze na celom molekulu TT-a. Pored toga, pokazano je i da MAt specifična za laki lanac botulinum toksina, toksin slične strukture i mehanizma delovanja, inhibiraju ulazak toksina u neuron i obezbeđuju zaštitu²⁶. Oba istraživanja pokazuju da maskiranje gangliozid vezujućeg mesta nije jedini način za sprečavanje interakcije klostridijalnih neurotoksina (uključujući i TT) sa ciljnom ćelijom. Iako u *Western blot* analizi MAt51 isključivo interaguje Lc TT-a, nije isključena mogućnost da u realnim uslovima, kada je nativni TT molekul dostupan, MAt51 interaguje sa konformacionim epitopima koji obuhvataju deo Hc TT-a. Takođe, vezivanjem MAt za epitope TT-a locirane izvan gangliozid-vezujućeg mesta može doći do promena u terciarnoj strukturi (uključujući i promene u konformaciji gangliozid-vezujućeg mesta) koje mogu rezultovati smanjenjem afiniteta TT-a ka gangliozidima¹⁶.

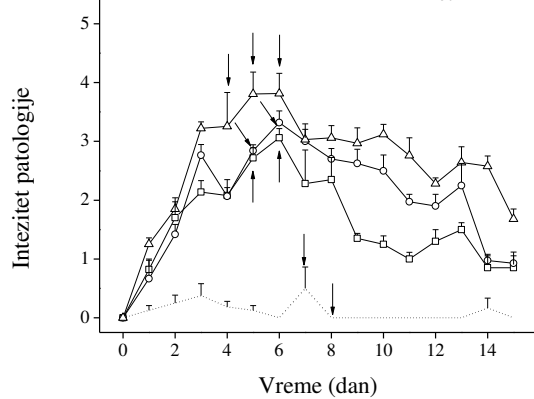
4.1.4 Terapeutski potencijal anti-TTd/TT MAt

S obzirom da se preparati na bazi TT-specifičnih antitela primenjuju nakon TT intoksikacije, efikasnost MAt koja su u prethodnom ogledu pokazala određeni zaštitni potencijal (MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71) je ispitana i u slučaju njihove primene nakon intoksikacije letalnom dozom TT-a. Na **Slici 4.5** su prikazane vremenski zavisne promene inteziteta patologije karakteristične za tetanus kod miševa kojima je najpre ubrizgana letalna doza TT, a potom su tretirani sa MAt33, MAt51, MAt39 i MAt71. U **Tabeli 4.3** su prikazani stepen preživljavanja, maksimalan intezitet patologije tetanusa i vreme oporavka miševa kojima je i.p. aplikovano 2LD₅₀ TT, a onda su nakon 2h, 6h i 24h tretirani odgovarajućim MAt. Zaštitni efekat MAt39 i MAt71 aplikovanih 24h nakon TT intoksikacije nije ispitivan jer je već u slučaju njihovog aplikovanja 6h nakon intoksikacije TT-om stopa preživljavanja bila manja od 50% (**Slika 4.5A**).



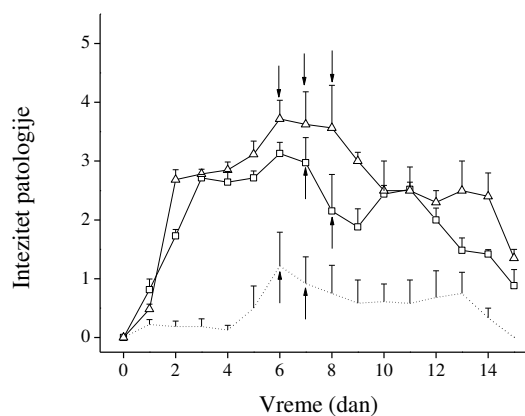
B) **MAT33:**

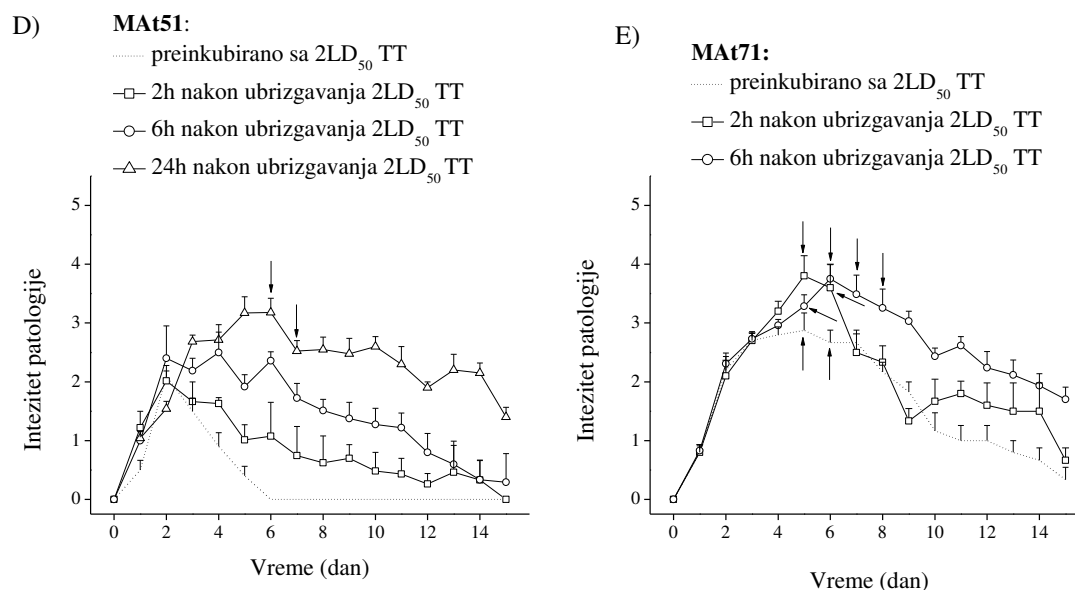
- preinkubirano sa $2LD_{50}$ TT
- 2h nakon ubrizgavanja $2LD_{50}$ TT
- 6h nakon ubrizgavanja $2LD_{50}$ TT
- △ 24h nakon ubrizgavanja $2LD_{50}$ TT



C) **MAT39:**

- pre-inkubirano sa $2LD_{50}$ TT
- 2h nakon ubrizgavanja $2LD_{50}$ TT
- △ 6h nakon ubrizgavanja $2LD_{50}$ TT





Slika 4.5. Stepen preživljavanja (A) i intezitet patologije nakon ubrizgavanja letalne doze TT preinkubiranog sa TT-specifičnim MAT u definisanim vremenskim tačkama (B-E). Miševima je i.p. aplikovana smeša TT preinkubiran (1h/RT) sa anti-TTd/TT MAT (2LD₅₀ TT sa 10 μg MAT; isprekidana linija) ili i.p. tretirani sa 2LD₅₀ TT, a onda 2h, 6h ili 24h kasnije su i.v. ubrizgana MAT (10 μg). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost inteziteta patologije ± standardna greška određene je za svakog miša u grupi (8-10 miševa po grupi) u definisanim vremenskim tačkama. Dan TT intoksikacije je označen kao 0. dan. Intezitet patologije tokom perioda nakon tretmana praćen je svakodnevno uzimajući u obzir (i) intezitet patologije miševa koji su bili živi u trenutku posmatranja; (ii) miševi koji su uginuli u trenutku posmatranja ili su eutanazirani prethodnog dana (ocene inteziteta patologije date su u odeljku Eksperimentalni rad). Strelice ukazuju na dane kada su pojedini miševi uginuli.

Dobijeni rezultati pokazuju da produžavanje perioda između TT intoksikacije i MAT administracije pozitivno korelira i sa smanjenjem stope preživljavanja i sa intenzitetom patologije (**Slika 4.5B-E**). Poređenjem inteziteta patologije miševa koji su bili živi u momentu posmatranja pokazuje da su miševi tretirani odgovarajućim MAT nakon TT intoksikacije imali izraženije simptome tetanusa u poređenju sa miševima koji su tretirani letalnom dozom TT-a preinkubiranom sa odgovarajućim MAT (*paired t*-test: pre-inkubirani TT/MAt33 vs. sve ispitivane vremenske tačke $P < 0,001$; preinkubirani TT/MAt39 vs. sve ispitivane vremenske tačke $P < 0,001$; preinkubirani TT/MAt51 vs. sve ispitivane vremenske tačke $P < 0,005$; preinkubirani TT/MAt71 vs. 2h $P=0,35$, vs. 6h $P=0,026$). Pokazano je i da postoji značajna razlika u jačini patologije između grupa tretiranih sa MAt33 (*paired T*-test: 2h vs. 6h $P=0,035$, 2h vs. 24h $P < 0,001$, 6h vs. 24h $P=0,004$) i MAt51 (*paired T*-test: 2h vs. 6h $P=0,001$, 2h vs. 24h $P=0,001$, 6h vs. 24h $P=0,026$) nakon TT intoksikacije.

Najbolji terapijski potencijal je pokazalo MAt51: stepen preživljavanja u grupi tretiranoj i nakon 2h i nakon 6h je bio 100% i uočene su najblaže kliničke slike u odnosu na ostale grupe (**Tabela 4.3**). Ujedno vreme oporavka za ove dve grupe je < 15 dana. U preostalim grupama pokretljivost je bila ozbiljno narušena i miševi se nisu oporavili do kraja opservacionog perioda (maksimalan intezitet patologije je bio u opsegu $3,1 \pm 0,2$ do $3,8 \pm 0,3$). Najniži stepen preživljavanja (40%) zabeležen je u grupi miševa tretiranoj sa MAt71 6h nakon intoksikacije TT-om.

Tabela 4.3. Stepen preživljavanja, intezitet patologije tetanusa i vreme oporavka miševa kojima je i.p. aplikovano: i) $2LD_{50}$ TT preinkubiran 1h sa odgovarajućim MAt; ii) $2LD_{50}$ TT, a onda su nakon 2h, 6h i 24h tretirani odgovarajućim MAt

MAt ^a , vreme ^b	Stepen preživljavanja (%)	Maksimalan intezitet patologije tetanusa ^{b,c}	Vreme oporavka ^c (dan)
MAt33, nakon 2h	80	$3,1 \pm 0,2$	> 15
MAt33, nakon 6h	80	$3,3 \pm 0,2$	> 15
MAt33, nakon 24h	70	$3,8 \pm 0,3$	> 15
MAt39, nakon 2h	80	$3,1 \pm 0,2$	> 15
MAt39, nakon 6h	70	$3,7 \pm 0,3$	> 15
MAt51, nakon 2h	100	$2,0 \pm 0,2$	$12,6 \pm 1,1$
MAt51, nakon 6h	100	$2,5 \pm 0,3$	> 14,2
MAt51, nakon 24h	80	$3,2 \pm 0,3$	> 15
MAt71, nakon 2h	60	$3,4 \pm 0,3$	> 15
MAt71, nakon 6h	40	$3,8 \pm 0,3$	> 15

^a Ubrizgano je 10 μ g MAt,

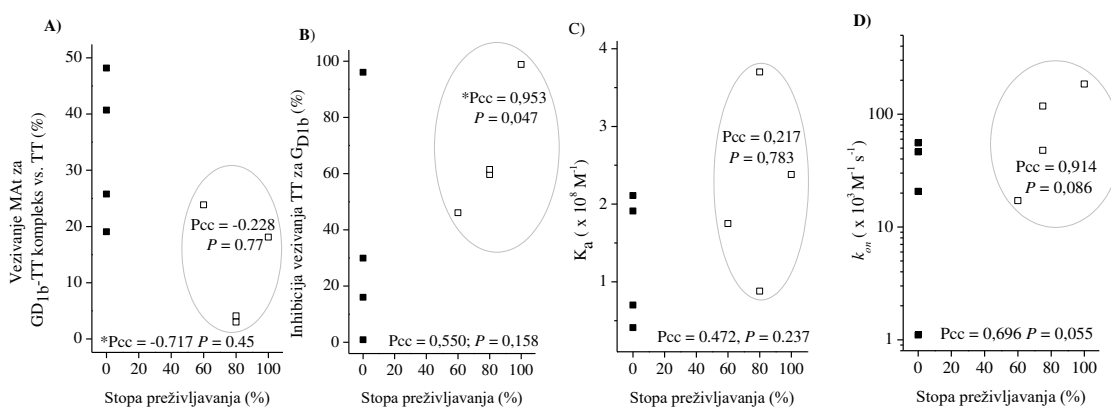
^b Vreme aplikacije odgovarajućih MAt je u odnosu na TT intoksikaciju,

^c Dan intoksikacije TT-om označen je kao 0.dan. Miševi su svakodnevno praćeni tokom 15 dana.

4.1.5 Korelaciona analiza zaštitnog potencijala i vezivnih karakteristika anti-TTd/TT MAt

Značaj pojedinih vezivnih karakteristika za zaštitni potencijal anti-TTd/TT MAt određene je koreliranjem *in vitro* određenih vezivnih karakteristika sa njihovim zaštitnim potencijalom u ogledu gde su miševi tretirani letalnom dozom TT-a preinkubiranom sa MAt.

Stopa preživljavanja je uzeta kao glavni kriterijum za procenu zaštitnog potencijala selektovanih MAt. Dobijeni rezultati su sumarno prikazani na **Slici 4.6**.



Slika 4.6. Bivarijantna *Pearson*-ova korelaciona analiza stepena preživljavanja miševa tretiranih sa preinkubiranim MAt/TT smešom i: **A)** veživanja za G_{D1b} -TT kompleks; **B)** sposobnosti da spreči G_{D1b} -TT interakciju; **C)** afiniteta MAt za TT; **D)** konstante brzine asocijacije. Podaci su predstavljani kao srednja vrednost \pm SE. Rezultati *Pearson*-ove bivarijantne korelacione analize koja je rađena za sva MAt su prikazana u donjem desnom uglu grafika. Rezultati analize su rađene za MAt koja obezbeđu protekciju (prazni kvadrati) su takođe prikazani na grafiku. (* $P < 0,05$).

Dobijeni rezultati pokazuju da MAt prepoznaju TT sa $K_a \geq 1 \times 10^8 M^{-1}$ i $k_{on} \geq 1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ i mogu da smanje veživanje za G_{D1b} za $\geq 50 \%$ (**Slika 4.6**). Korelaciona analiza za MAt grupisane prema kriterijumu $K_a \geq 1 \times 10^8 M^{-1}$ (MAt26 i MAt41 su izuzeti iz analize) pokazuje da stopa preživljavanja značajno negativno korelira sa veživanjem za G_{D1b} -TT kompleks (Pcc = -0,883, $P = 0,020$), a pozitivno korelira sa sposobnošću MAt da spreči nastajanje TT- G_{D1b} kompleksa (Pcc = 0,972, $P = 0,028$). Takođe, iz dobijenih rezultata se može zaključiti da zaštitni potencijal MAt koja imaju $K_a \geq 1 \times 10^8 M^{-1}$ značajnije određuje njihova sposobnost da spreče TT-gangliozid interakciju nego afinitet *per se* (stopa preživljavanja vs. K_a : Pcc = 0,426; $P = 0,574$). Grupisanje ispitivanih MAt prema drugim pomenutim kriterijumima ($k_{on} \geq 1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, MAt26 izuzet; smanjenje veživanja TT za $G_{D1b} \geq 50 \%$, MAt26, MAt42 i MAt62 izuzeti) nije pokazalo nikakvu statistički značajnu korelaciju između stope preživljavanja i vrednosti dobijenih u *in vitro* testovima.

Dobijeni rezultati jasno ukazuju da zaštitni kapacitet MAt određuju i njegov afinitet ka TT i sposobnost da spreči TT-gangliozid interakciju. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da MAt koje je sposobno da *in vivo* štiti od TT intoksikacije mora da vežuje TT sa afinitetom $\geq 1 \times 10^8 M^{-1}$ i da je sposobno da inhibira

uspostavljanje TT-G_{D1b} interakcije. Predloženi kriterijumi za odabir MAt su u skladu sa predloženim kriterijumima za MAt koja mogu da obezbede zaštitu od botulinum toksina²³. Marks i saradnici su takođe pokazali da je za zaštitu od intoksikacije botulinum toksinom afinitet MAt krucijalan, dok je pozicija ciljnog epitopa manje značajna. Istraživanja ove grupe su da MAt specifična za epitope koje nisu locirani na Hc domenu botulinum toksina mogu da budu takođe da spreče internalizaciju botulinum toksina²⁶.

Ovaj pristup za primarnu selekciju protektivnih MAt u spektru TT-specifičnih MAt je jednostavan i primenljiv ne samo na mišja TT-specifična MAt proizvedena hibridoma tehnologijom, već i na humane i humanizovane TT-vezujuće fargmente (Ab, Fab, F(ab)₂, scFv) dobijene tehnikama koje se zasnivaju na rekombinantnoj tehnologiji.

4.2 Značaj kooperativnog vezivanja anti-TTd/TT MAt u dizajniranju preparata za prevenciju intoksikacije tetanus toksinom

Brojna istraživanja su pokazala da preparati na bazi pojedinačnih MAt, pored prednosti koje imaju u odnosu na standardno korišćene poliklonske preparate, imaju određena ograničenja koja su prvenstveno posledica njihove striktno epitopske specifičnosti¹⁸. Oligoklonske smeše MAt predstavljaju jedan od načina prevazilaženja tog ograničenja. Pored toga, oligoklonske smeše omogućavaju stvaranje većih imunokompleksa i samim tim efikasnije uklanjanje ciljnog antigena¹⁹⁻²¹. Treba napomenuti i da je u okviru molekula TT (150 kDa) prisutno najmanje 25-30 različitih antigenih determinanti^{17,42,100} tako da simultano vezivanje više anti-TTd/TT At različitih vezivnih karakteristika povećava mogućnost bolje inhibicije vezivanja toksina za ciljne ćelije i efikasnije aktiviranje mehanizama adaptivne imunosti kojima se uklanjaju nastali imunokompleksi^{17,101-103}.

Pri kombinovanju različitih antitela može se očekivati: aditivni efekat - sabiranje neutralizacionih sposobnosti pojedinačnih MAt; antagonizam - smanjenje efikasnosti pojedinačnih MAt usled kombinovanja; indiferentnost - nepostojanje međusobnog uticaja At, i sinergizam - drastično povećanje zaštitnog kapaciteta usled kombinovanja MAt¹⁰³.

Imajući navedene činjenice u vidu, urađen je set eksperimenata čiji su ciljevi bili da se okarakterišu interakcije biklonalnih ekvimolarnih preparata (BEP) sa TT-om, utvrdi kako one koreliraju sa *in vivo* zaštitnim potencijalom BEP i pokaže da li je kombinovanje MAt rezultovalo poboljšanjem protektivnog kapaciteta BEP u odnosu na pojedinačna MAt. Polazeći od preporuke da se za pripremu oligoklonskih preparata preporučuje kombinovanje MAt koja imaju sposobnost neutralizacije Ag²² i pokazuju određen zaštitni potencijal¹², ovom setu istraživanja su analizirani BEP napravljeni od MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71.

4.2.1 Ispitivanje mogućnosti simultanog vezivanja anti-TTd/TT BEP za TT

Pri pravljenju oligoklonskih preparata za koje se očekuju da imaju bolje karakteristike od svojih konstituenata potrebno je preventivno zadovoljiti sledeći uslov: MAt koja se kombinuju treba da prepoznaju različite, nepreklapajuće, epitope što omogućava njihovo simultano vezivanje za ciljni antigen¹⁰³. *Western blot* analizom je pokazano da MAt51 interaguje sa delom sekvence lakog lanca TT-a dok MAt33, MAt39 i MAt71 prevalentno prepoznaju sekvencione epitope koji se nalaze u okviru teškog lanca TT molekula (**Slika 4.1**)^{35,94,104}. Taj nalaz ne daje informaciju o lokalizaciji, strukturi i uzajamnoj udaljenosti primarnih epitopa ovih MAt, dostupnih u molekulu TT-a u nativnoj konformaciji. Procena međusobne udaljenosti epitopa TT-a koje selektovana MAt prepoznaju urađena je na osnovu indeksa aditiviteta (IA) za definisane parove MAt (**Tabela 4.4**). Indeks aditiviteta manji od 20 ukazuje da MAt prepoznaju isti epitop ili blisko pozicionirane epitope i da se ona, usled sterne smetnje, ne mogu istovremeno vezati za antigen. MAt koja imaju $20 < IA < 40$ mogu istovremeno da se vežu, ali sterna smetnja ipak postoji, dok se MAt za koje je $IA > 40$ mogu nesmetano, istovremeno vezati za antigen^{105,106}.

Tabela 4.4. Indeksi aditiviteta za MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71

Parovi MAt ^a	IA ^b
MAt33 / MAt39	60,52 ± 2,01
MAt33 / MAt51	46,59 ± 1,30
MAt33 / MAt71	67,88 ± 3,22
MAt39 / MAt51	52,82 ± 5,78
MAt39 / MAt71	71,97 ± 5,85
MAt51 / MAt71	101,23 ± 7,27

^a Parovi MAt - ispitivana MAt u saturujućim koncentracijama

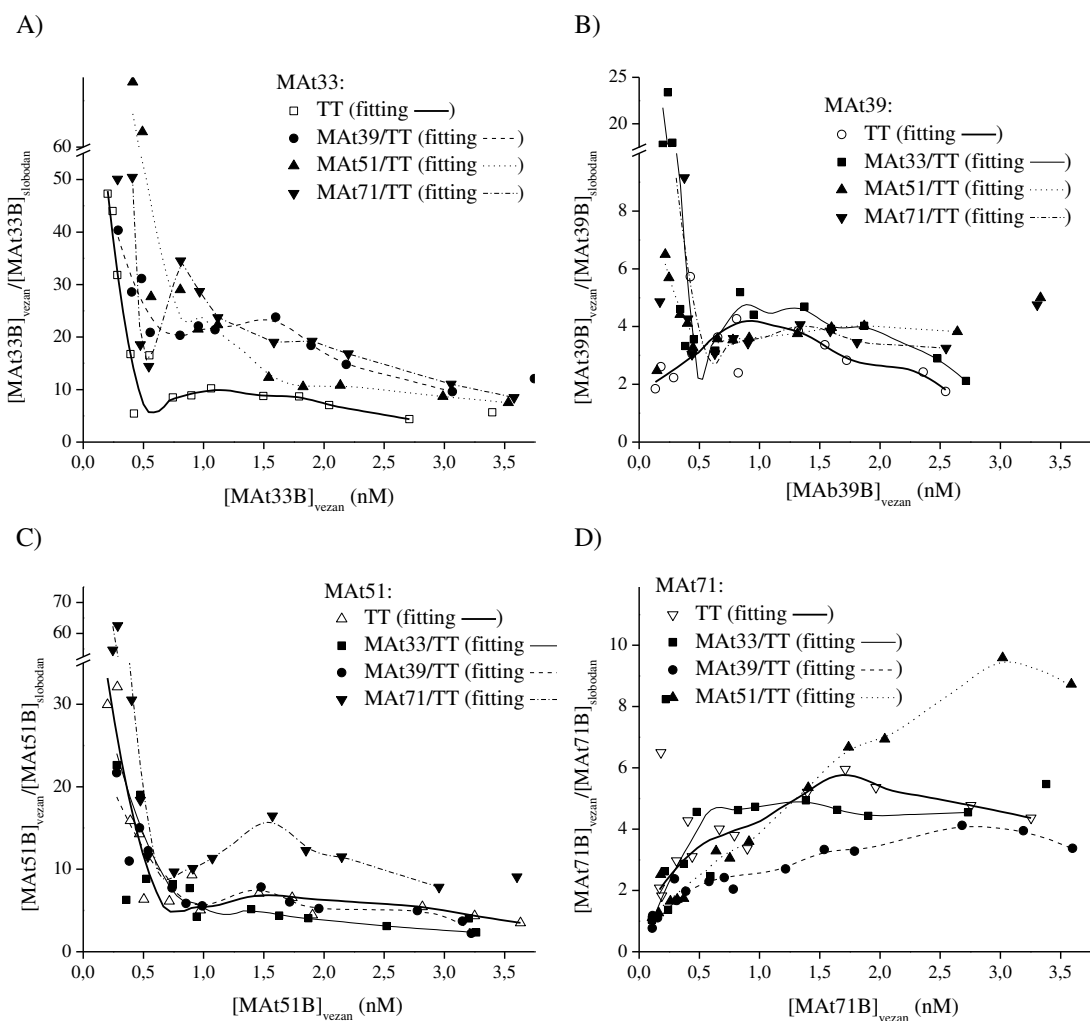
^b IA –indeks aditiviteta, srednja vrednost IA ± standardna greška tri nezavisna merenja

Prema dobijenim rezultatima, gde su vrednosti IA za sve parove MAt bili veći od 40 (**Tabela 4.4**), selektovana MAt interaguju sa epitopima koji su dovoljno udaljeni

tako da ne postoje sterne smetnje za simultano vezivanje za TT. Ovaj nalaz je pokazao da se MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71 mogu koristiti za pravljenje BEP.

4.2.2 Uzajamni uticaj anti-TTd/TT MAt pri vezivanju za TT

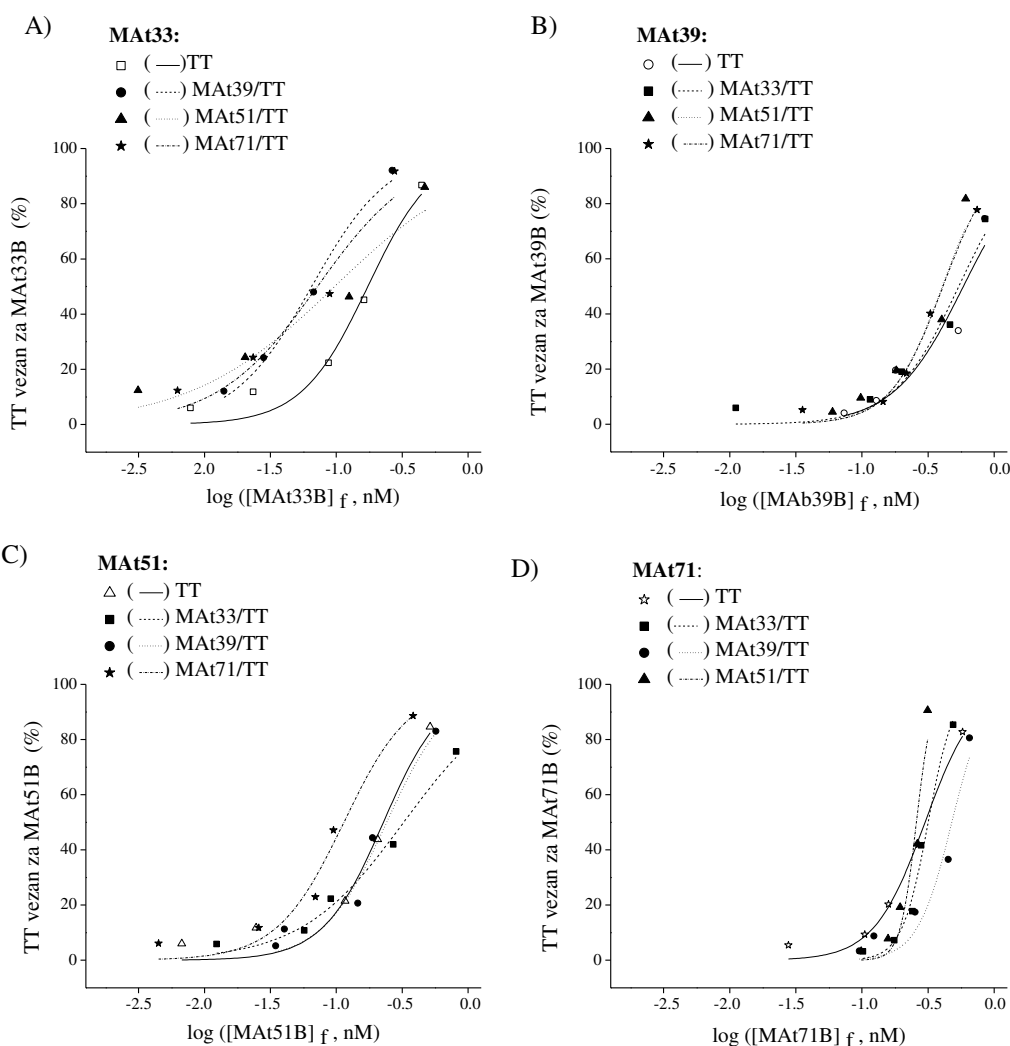
U slučaju simultanog vezivanja dva MAt, fleksibilnost proteinskih antigena i mogućnosti da MAt svojim vezivanjem indukuju konformacione promene u ciljnom proteinu može dovesti do promene karakteristika interakcije antigen – MAt u poređenju sa situacijom kada je antigen izložen samo jednom MAt. U tim slučajevima se govori o kooperativnom vezivanju dva MAt. Uzajamni uticaj vezivanja MAt za Ag je individualan i može biti pozitivan ili negativan. Negativno kooperativno vezivanje podrazumeva da vezivanje jednog At sprečava vezivanje drugog At usled konformacionih promena⁹³. Pozitivno kooperativno vezivanje podrazumeva situaciju gde vezivanje jednog At dovodi do promena u 3D strukturi ciljnog proteina tako da se stvara povoljnija konformacija za vezivanje drugog MAt odnosno omogućava termodinamički povoljnija interakcija drugog MAt i Ag¹⁰⁷. Međusobni uticaj selektovanih MAt pri vezivanju za TT je ispitivan u parovima pri čemu je MAt čije je vezivanje analizirano korišćeno u biotinisanoj formi, u nizu koncentracija, a MAt koje je korišćeno kao modulator vezivanja analiziranog MAt je u fiksnoj koncentraciji preinkubirano sa TT-om. Uticaj modulatornog MAt je procenjivan na osnovu promena u vezivanju analiziranog MAt u odnosu na njegovo vezivanje za sam TT. Vezivanja analiziranog MAt za TT i TT kompleksiran sa modulatornim MAt preliminarno su predstavljeni u formi *Scatchard*-ovih grafikona (**Slika 4.7A-D**).



Slika 4.7. Scatchard-ova analiza kooperativnog vezivanja A) MAT33, B) MAT39, C) MAT51 i D) MAT71. Ispitivano je vezivanje svakog MAT za TT ili za TT koji je preinkubiran sa jednim od tri selektovana MAT u rastvoru. Dobijeni rezultati su predstavljeni u formi Scatchard-ovog dijagrama: koncentracija MAT-B vezan za TT ($[MAT]_{vezan}$) u zavisnosti od koncentracije MAT koja je ostala slobodna u rastvoru ($[MAT]_{vezan}/[MAT]_{slobodan}$).

Dobijeni Scatchard-ovi grafikoni su bili nelinearni, što može da ukaže na određeno kooperativno vezivanje dva MAT^{93,108}. Vezivanje analiziranog MAT za TT i TT kompleksiran sa modulatornim MAT su predstavljani u formi semilogaritamskog Klotz-ovog grafika u cilju dobijanja numeričkih parametara na osnovu kojih bi se mogle pratiti promene u vezivanju (Slika 4.8). Uticaj modulatornog MAT na vezivanje analiziranog MAT procenjen je na osnovu određenih MAT_{f,50%} vrednosti tj. koncentracije slobodnih analiziranih MAT-B (MAT33-B, MAT39-B, MAT51-B i MAT71-B) u rastvoru gde je 50% TT vezano za određeno MAT-B (MAT33_{f,50%}, MAT39_{f,50%}, MAT51_{f,50%} i MAT71_{f,50%}). MAT_{f,50%} vrednosti su određene nakon sigmoidnog dozno-zavisnog

fitovanja krive $f(\log(\text{koncentracija slobodnog MAT-B})) = (\% \text{ vezanog MAT-B za TT})$ (Slika 4.8) i predstavljena u tabeli ispod grafikona na Slici 4.8. S obzirom da je $\text{MAT}_{f,50\%}$ je srazmerna K_d , povećanje $\text{MAT}_{f,50\%}$ ukazuje na negativno kooperativno vezivanje, a smanjenje na pozitivno kooperativno vezivanje⁹³.



Antigen	$\text{MAT}_{33f,50\%}$ (nM)	$\text{MAT}_{39f,50\%}$ (nM)	$\text{MAT}_{51f,50\%}$ (nM)	$\text{MAT}_{71f,50\%}$ (nM)
TT	$0,17 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,02$
MAT33/TT	/	$0,50 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,04^*$	$0,33 \pm 0,02$
MAT39/TT	$0,08 \pm 0,01^{**}$	/	$0,26 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,02^{***}$
MAT51/TT	$0,10 \pm 0,02^{**}$	$0,39 \pm 0,02$	/	$0,27 \pm 0,01$
MAT71/TT	$0,08 \pm 0,01^{**}$	$0,41 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01^*$	/

Slika 4.8. Uporedna analiza kooperativnog vezivanja A) MAT33, B) MAT39, C) MAT51 i D) MAT71. Ispitivano je vezivanje svakog MAT-B (opseg koncentracija od 0,03 $\mu\text{g/mL}$ do 4 $\mu\text{g/mL}$) za TT (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ili za TT preinkubiranim sa jednim od tri selektovana MAT (0,5 $\mu\text{g/mL}$ TT + 0,5 $\mu\text{g/mL}$ MAb; MAb/TT) u rastvoru. Na graficima je predstavljena koncentracija vezanog TT = $f\{\log(\text{koncentracija MAT-B}_f)\}$. Koncentracija slobodnog MAT33-B, MAT39-B, MAT51-B i MAT71-B u rastvoru, kada je 50% TT vezano za

određeno MAT-B ($MA_{t33f,50\%}$, $MA_{t39f,50\%}$, $MA_{t51f,50\%}$ i $MA_{t71f,50\%}$), izračunata je pomoću softvera Origin 8/ Nonlinear Curve Fitting / Dose-response curve i vrednosti \pm standardna greška su predstavljene u tabli. Podaci su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta u okviru kojih je svaki uzorak analiziran u triplikatu (svaka tačka predstavlja srednju vrednost logarima koncentracije slobodnog MAT-B u odnosu na srednju vrednost procenata vezanog TT). Statistička značajnost vezivanja određenog MAT-B za TT u odnosu na vezivanje datog MAT-B za TT koji je prethodno preinkubiran sa jednim od tri ispitivana MAT određena je uporednim t-testom (* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,001$).

Dobijeni rezultati ukazuju na: značajan pozitivan efekat MAT39, MAT51 i MAT71 na vezivanje MAT33 za TT; (ii) pozitivan efekat MAT51 i MAT71 na vezivanje MAT39 za TT; (iii) značajan pozitivan efekat MAT71 i negativan efekat MAT33 na vezivanje MAT51 za TT, i (iv) negativni efekat MAT39 na vezivanje MAT71 za TT.

4.2.3. Vezivne karakteristike TT-specifičnih-BEP

U ovom setu *in vitro* testiranja ispitana je sposobnost BEP da inhibiraju uspostavljanje TT- G_{D1b} interakcije, određen njihov afinitet za TT i potenca.

Dobijeni rezultati su pokazali da BEP MAT33/MAT51 i MAT51/MAT71 najefikasnije inhibiraju vezivanje TT za G_{D1b} (Tabela 4.5). Formiranje TT- G_{D1b} kompleksa je skoro potpuno inhibirano nakon preinkubiranja TT sa MAT33/MAT51 ($92,6 \pm 0,9 \%$) i MAT51/MAT71 ($93,2 \pm 1,8 \%$), dok je BEP MAT39/MAT71 najslabije inhibirala vezivanje TT za G_{D1b} ($55,6 \pm 4,1 \%$).

Konstante prosečnog afiniteta BEP prema TT, parametar koji ukazuje na stabilnost nastalog kompleksa i u velikoj meri određuje efikasnost antitela kao terapeutika⁹⁶, je određena *Scatchard*-ovom metodom modifikovanom prema *Stivens*-u⁹² pod istim uslovima kao za pojedinačna MAT (odjeljak 4.1.2). Afiniteti svih ispitivanih BEP za TT su bili $> 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Tabela 4.5) čime su ispunile jedan od prethodno definisanih parametara da budu razmatrane kao terapeutici.

Osim toga, određene *in vitro* potence za sve ispitivane BEP (MAT33/MAT39, MAT33/MAT51, MAT33/MAT71 i MAT51/MAT71) su bile više nego potence pojedinačnih MAT koja ulaze u sastav BEP-a (Tabela 4.5)¹⁰⁴. BEP MAT51/MAT71 poseduje najveću *in vitro* potencu. Bivarijantnom korelacionom analizom pokazano je da postoji značajna pozitivna korelacija između potenci BEP-a i njihovog afiniteta ka TT-u ($P_{cc} = 0,981$, P

= 0,001), kao i njihovog inhibitorynog efekta na TT- G_{D1b} interakciju ($P_{cc} = 0,816$, $P = 0,048$).

Tabela 4.5. Sposobnost inhibicije TT- G_{D1b} vezivanja, afinitet za TT i potenca određena za BEP

BEP ^a	Inhibicija vezivanja TT za G_{D1b} (%) ^b	Afinitet ($\times 10^8 M^{-1}$) ^c	<i>In vitro</i> potenca (IU/mg MAT)
MA _t 33 / MA _t 39	79,4 ± 4,0	5,4 ± 0,7 ($R > 0,92$)	145,6 ± 5,9
MA _t 33 / MA _t 51	92,6 ± 0,9	21,9 ± 2,8 ($R > 0,91$)	407,3 ± 17,6
MA _t 33 / MA _t 71	72,2 ± 4,5	8,8 ± 1,4 ($R > 0,86$)	223,1 ± 12,4
MA _t 39 / MA _t 51	65,1 ± 3,6	5,8 ± 0,6 ($R > 0,98$)	140,3 ± 10,9
MA _t 39 / MA _t 71	55,6 ± 4,1	8,6 ± 0,9 ($R > 0,94$)	115,5 ± 14,4
MA _t 51 / MA _t 71	93,2 ± 1,8	32,3 ± 2,1 ($R > 0,98$)	695,3 ± 15,5

^a BEP – biklonalni ekvimolarni preparat;

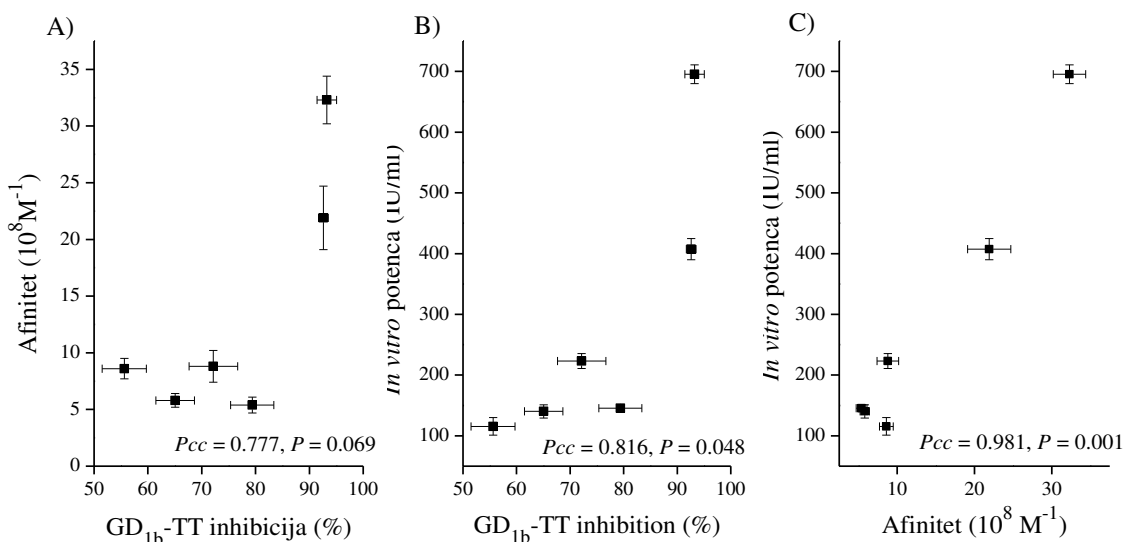
^b Finalna koncentracija pojedinačnih MA_t je podešena na 5 μ g/mL tako da je ukupna koncentracija MA_t bila 10 μ g/mL

^c R vrednost za linearizaciju je istaknuta u zagradama

^d Srednja vrednost izračunata na osnovu *in vitro* određenih potenci za pojedinačna MA_t u istim uslovima : 133,52 ± 0,72 IU/mg za MA_t33; 122,31 ± 0,56 IU/mg za MA_t39; 358,17 ± 1,50 IU/mg za MA_t51; 104,06 ± 0,83 IU/mg za MA_t71

^e Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardna greška tri nezavisna merenja.

Bivarijantnom korelacionom analizom pokazano je da postoji značajna pozitivna korelacija između potence i afiniteta BEP ($P_{cc} = 0,981$, $P = 0,001$), kao i njihove sposobnosti da inhibiraju TT- G_{D1b} interakciju ($P_{cc} = 0,816$, $P = 0,048$) (Slika 4.9).



Slika 4.9. Bivarijantna *Pearson*-ova korelaciona analiza vezivnih karakteristika BEP-a. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardnih grešaka: (A) inhibicije vezivanja TT za G_{D1b} (%); (B) afinitet BEP-a ka TT; (C) *in vitro* potence BEP-ova. Dobijeni rezultati predstavljeni su donjem desnom uglu grafika.

Dobijeni rezultati pokazuju da su vezivne karakteristike BEP-a uglavnom bolje u odnosu na karakteristike njihovih konstituenata. Činjenica da je prosečan afinitet BEP-aza TT veći u odnosu na pojedinačna MAt ukazuje na dominantno kooperativno vezivanje.

4.2.4 Zaštitni potencijal TT-specifičnih BEP

Zaštitni potencijal TT-specifičnih BEP ispitan je *in vivo* u modelu gde su miševi i.p. tretirani letalnom dozom TT preinkubiranom sa određenom BEP. Pokazano je da preinkubacija TT-a sa 4 od 6 ispitivanih BEP (MAt33/MAt39, MAt33/MAt51, MAt33/MAt71 i MAt51/MAt71) u potpunosti prevenira letalni ishod intoksikacije TT-om (**Tabela 4.6**). Stepenn preživljavanja miševa tretiranih TT-om preinkubiranim sa MAt33/MAt39, MAt33/MAt51, MAt33/MAt71 i MAt51/MAt71 je bila 100%.

Tabela 4.6. Stepenn preživljavanja, maksimalan intezitet patologije tetanusa i vreme oporavka miševa nakon i.p. ubrizgavanja 2LD₅₀TT preinkubirane 1h sa naznačenim BEP

BEP ^a	Stepenn preživljavanja (%) ^b	Maksimalan intezitet patologije tetanusa ^{b,c}	Vreme oporavka (dan) ^{b,c,d}
MAt33 / MAt39	100	0,7 ± 0,3	4,8 ± 0,6
MAt33 / MAt51	100	0,2 ± 0,1	1,6 ± 0,7
MAt33 / MAt71	100	0,8 ± 0,1	4,4 ± 0,2
MAt39 / MAt51	80	1,2 ± 0,1	8,0 ± 0,4
MAt39 / MAt71	60	2,0 ± 0,3	9,7 ± 0,7
MAt51 / MAt71	100	0,9 ± 0,1	2,6 ± 0,5

^a BEP – biklonalni ekvimolarni preparat

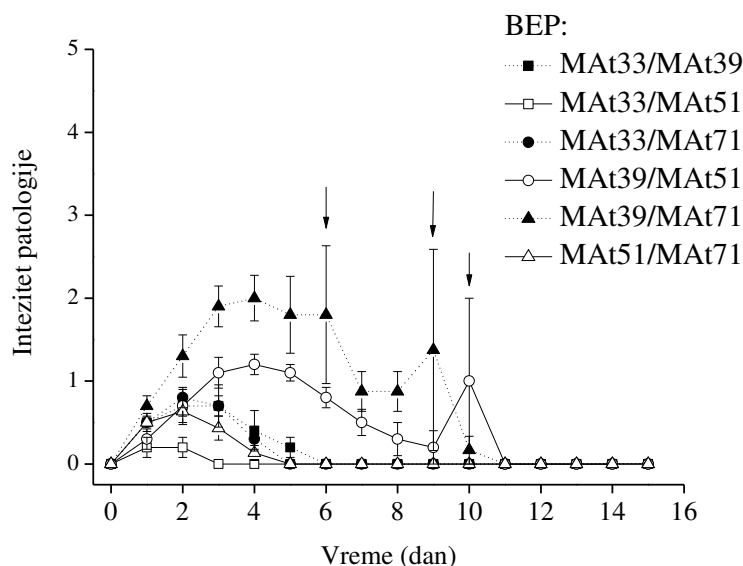
^b Zbirni rezultati dva nezavisna eksperimenta u okviru kojih je korišćeno 10 miševa po grupi

^c Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti ± SE izračunate za miševe koji su preživeli TT intoksikaciju (do 20 miševa po grupi, u zavisnosti od stepena preživljavanja)

^d Dan ubrizgavanja letalne doze TT je računat kao dan 0.

Promene u intezitetu patologije tetanusa nakon i.p. ubrizgavanja letalne doze TT preinkubirane sa odgovarajućim BEP su predstavljene na **Slici 4.10**. Najbolji zaštitni potencijal je imala BEP MAt33/MAt51: stepenn preživljavanja u ovoj grupi je bio 100%, značajne patološke promene su izostale (najveći intezitet patologije je bio 0,2 ± 0,1) i

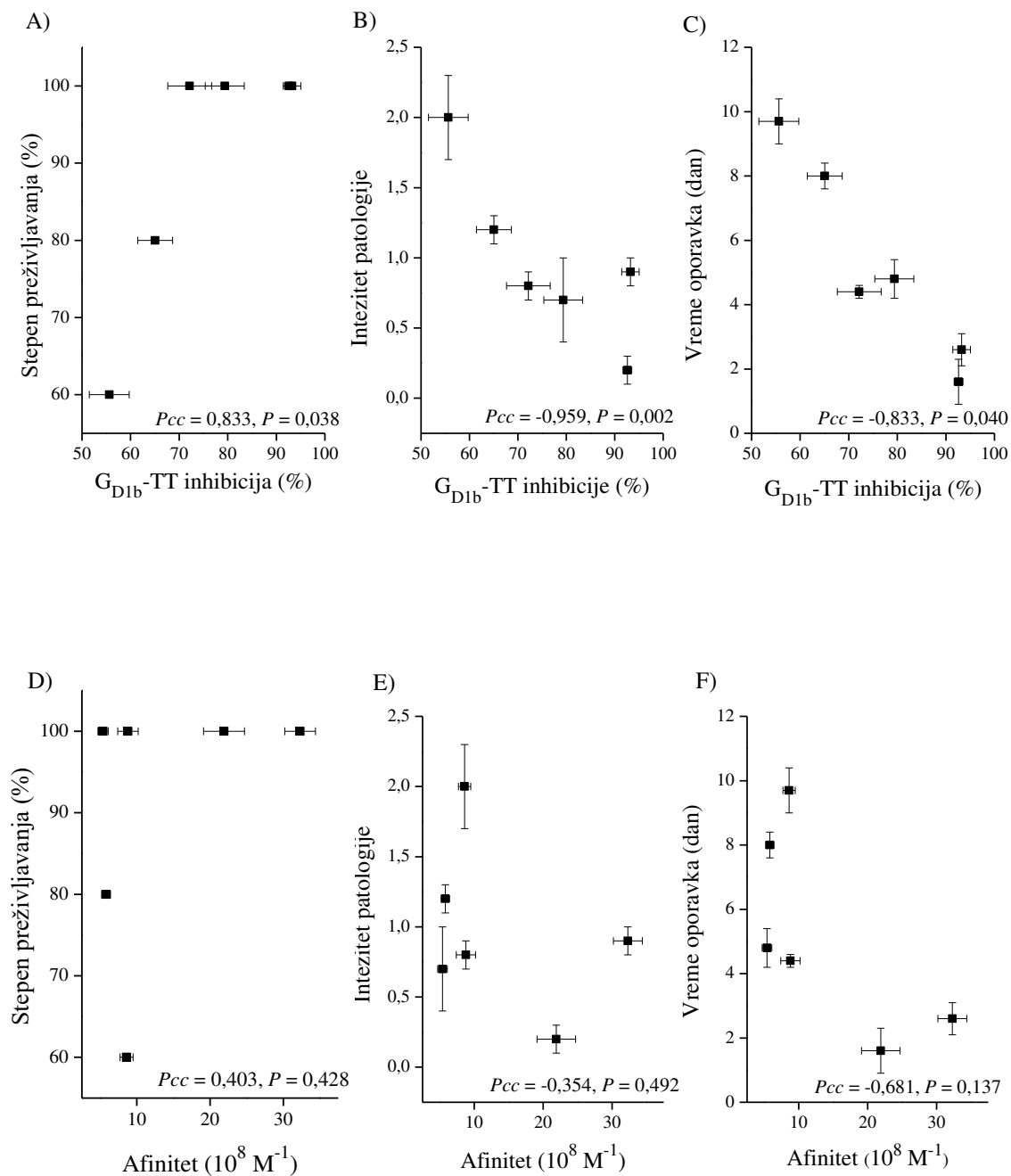
period oporavka je bio najkraći ($1,6 \pm 0,7$ dana). Najlošija klinička slika je zabeležena kod miševa tretiranih TT-om preinkubiranim sa MAt39/MAt71, ali i u ovoj grupi, kod miševa koji su preživeli TT-intoksikaciju (stepen preživljavanja 60%), pokretljivost nije bila ozbiljno narušena (najveći intenzitet patologije $2,0 \pm 0,3$).

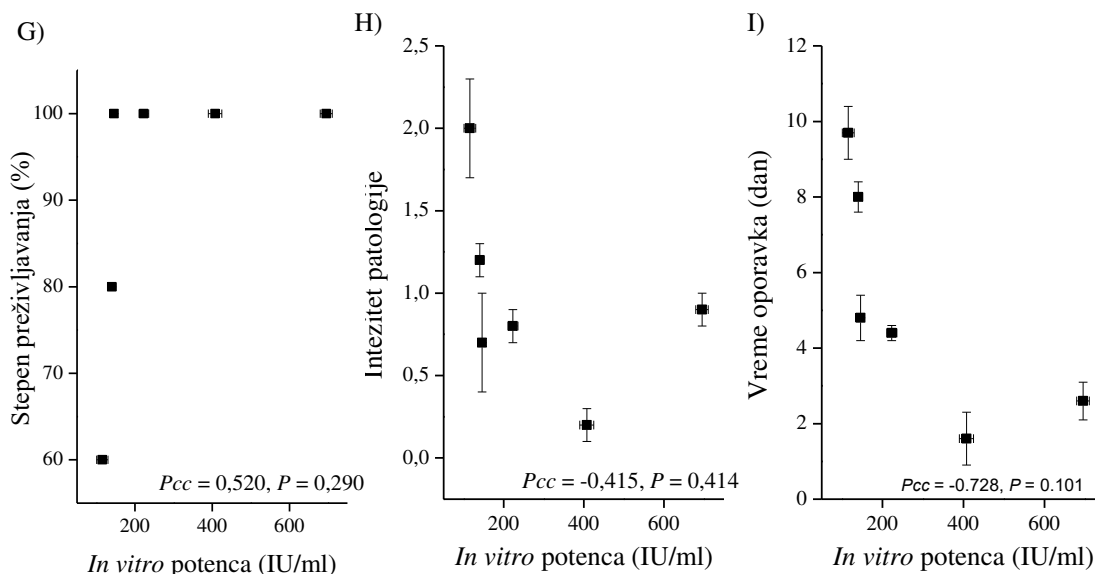


Slika 4.10. Intenzitet patologije \pm S.E miševa nakon ubrizgavanja letalne doze TT preinkubiranog sa TT-specifičnim BEP. Miševima je i.p. aplikovano TT ($2LD_{50}$) preinkubirane (1h/RT) sa MAt33/MAt39, MAt33/MAt51, MAt33/MAt71, MAt39/MAt51, MAt39/MAt71 i MAt51/MAt71 ($5 \mu\text{g}$ pojedinačno MAt, oba MAt $10 \mu\text{g}$). Rezultati su dobijeni u dva nezavisna eksperimenta (10 miševa po grupi u dva eksperimenta; ukupno 20 miševa po grupi) i predstavljeni su kao srednja vrednost intenziteta patologije \pm standardna greška za svakog miša u grupi. Dan TT intoksikacije je označen kao 0. dan. Intenzitet patologije tokom perioda nakon tretmana praćen je svakodnevno uzimajući u obzir (i) intenzitet patologije miševa koji su bili živi u trenutku posmatranja; (ii) miševe koji su uginuli u trenutku posmatranja ili su eutanazirani prethodnog dana (ocene intenziteta patologije date su u odeljku Eksperimentalni rad). Strelice ukazuju na dane kada su pojedini miševi uginuli.

Bivarijantnom Pearson-ovom analizom određen je stepen i značajnost korelacije zaštitnog potencijala BEP-a i njihove sposobnosti da inhibiraju vezivanja TT za G_{D1b} , afiniteta BEP-a ka TT i *in vitro* potence BEP-a (Slika 4.11). Stepen preživljavanja bio je u značajnoj korelaciji jedino sa sposobnošću inhibicije TT- G_{D1b} interakcije ($P_{cc} = 0,833$; $P = 0,038$). Dobijeni rezultat je u skladu sa prethodnim rezultatima koji pokazuju da je neophodno da MAt poseduju i sposobnost da inhibiraju TT-gangliozid interakciju da bi posedovala zaštitni efekat. Konačno, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za pojedinačna anti-TTd/TT MAt gde je takođe pokazano da je protektivni kapacitet MAt sposobnih da neutrališu TT u rastvoru određuje afinitet ($K_a > 10^8 \text{ M}^{-1}$) kao i njihova sposobnost da spreče inicijalni kontakt TT sa neuronom (TT-

G_{D1b} interakcija). Afinitet ($> 10^8 M^{-1}$) i potenca ne utiču na stepen preživljavanja, kao ni na ozbiljnost kliničke slike.





Slika 4.11. Bivarijantna *Pearson*-ova korelaciona analiza vezivnih karakteristika BEP-a (x-osa) i parametara koji opisuju težinu kliničke slike sistemskog tetanusa miševa koji su tretirani sa letalnom dozom TT i specifičnim BEP-ovima (10 μ g oba MAT)(y-osa). Podaci su predstavljani kao srednja vrednost \pm SE. Izračunate srednje vrednosti \pm SE inhibicije vezivanja TT za G_{D1b} (A-C), afiniteta BEP-a ka TT (D-F) i *in vitro* potence BEP-ova (G-I) su korelirane bivarijantnom *Pearson*-ovom korelacionom analizom sa stepenom preživljavanja, pojedinačnim maksimalnim intenzitetom patologije i vremenom oporavka. Dobijeni rezultati predstavljani su donjem desnom uglu grafika.

Među MAT koja su korišćena za pripremu BEP, MAT71 je imalo najslabiji zaštitni potencijal. Zaštitni potencijal BEP u čiji sastav ulazi MAT71 (MAT71 predstavlja 50% BEP) je bio značajno bolji u poređenju sa primenom pojedinačnog MAT71 u duplo većoj količini¹⁰⁴. U odnosu na TT/MAT71 tretirane miševe, maksimalni intenzitet patologije kod miševa tretiranih letalnom dozom TT-a preinkubiranom sa BEP koje sadrže MAT71 je bio statistički značano niži: $0,9 \pm 0,1$ za TT//MAT51/MAT71 ($P < 0,005$), $2,0 \pm 0,3$ za TT//MAT39/MAT71 ($P < 0,05$) i $0,8 \pm 0,1$ za TT//MAT33/MAT71 ($P < 0,005$). Među BEP koje sadrže MAT71, najefikasniji *in vivo* je bio BEP MAT51/MAT71. Pokazano je da je BEP MAT51/MAT71 efikasniji u odnosu na BEP MAT71/MAT33 jer je vreme oporavka miševa tretiranih sa TT//MAT51/MAT71 bilo statistički značajno kraće u poređenju sa miševima tretiranim sa TT//MAT33/MAT71 ($P < 0,05$), dok su intenzitet patologije i stepen preživljavanja bili isti (**Tabela 4.6**).

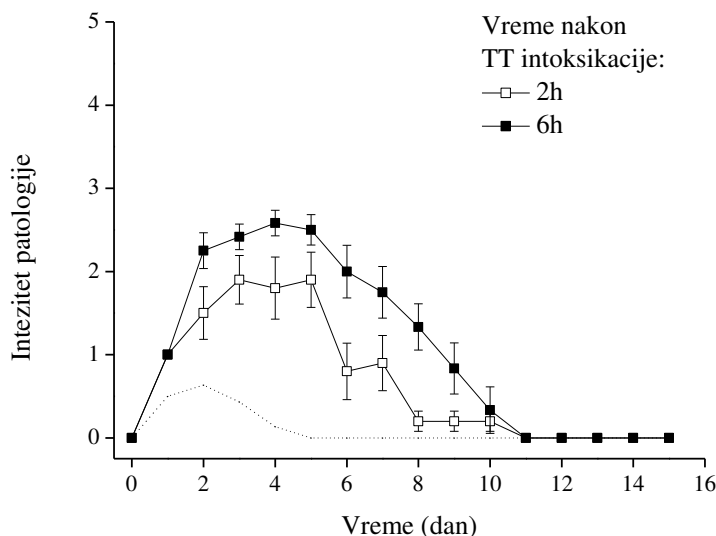
Zaštitni potencijal ispitivanih BEP, procenjen na osnovu stepena preživljavanja, u pozitivnoj korelaciji sa njihovim potencijalom da spreči TT- G_{D1b} interakciju ($P_{cc} = 0,837$, $P = 0,038$). Odsustvo značajne pozitivne korelacije između afiniteta BEP i zaštitnog potencijala procenjenog na osnovu stope preživljavanja ukazuje da u slučaju primene visoko afinitetnih TT-specifičnih preparata u velikom višku u odnosu na TT

(10 μ g MAt vs \sim 1 ng TT po kg telesne težine)³, zaštitni potencijal dominantno određuje fina epitopska specifičnost BEP.

4.2.5 Terapeutski potencijal TT-specifičnih BEP

U poređenju sa odgovarajućim pojedinačnim MAt, najznačajnije poboljšanje vezivnih karakteristika i protektivnog kapaciteta postignuto je kombinovanjem MAt51 i MAt71 gde su oba MAt međusobno pozitivno uticala na vezivanje za TT. Stoga je ovaj BEP izabran za testiranje terapijskog potencijala.

Dobijeni rezultati su pokazali da BEP MAt51/MAt71 ispoljava veću terapijsku efikasnost u poređenju sa pojedinačnim MAt51 i MAt71 (**Slika 4.5**). Stepenn preživljavanja miševa kojima je i.v. ubrizgan BEP MAt51/MAt71 2h i 6h nakon TT intoksikacije (**Slika 4.12**) je bio 100%. Maksimalan intenzitet patologije kod miševa kojima je nakon 2h od intoksikacije TT-a ubrizgan MAt51/MAt71 bio je $1,9 \pm 0,3$, dok je kod miševa koji su primili terapiju nakon 6h od intoksikacije TT-om bio $2,6 \pm 0,2$. Uočeni intenzitet patologije je bio sličan intenzitetu patologije miševa terapijski tretiranih sa MAt51 (**Slika 4.5**), ali je vreme oporavka miševa tretiranih sa BEP MAt51/MAt71 (2h: $9,8 \pm 1,0$ dana, 6h: $11,7 \pm 0,3$ dana) bilo je statistički značajno kraće ($P < 0,05$ u oba slučaja).



Slika 4.12. Intezitet patologije miševa tretiranih sa BEP MAAt51/MAAt71 2h i 6h nakon i.p. ubrizgavanja letalne doze TT. Miševima je najpre i.p. aplikovano TT ($2LD_{50}$), a nakon 2h i 6h tretirani su sa MAAt51/MAAt71 (ukupno MAAt $10 \mu\text{g}$, i.v.). Promene inteziteta patologije miševa tretiranih sa $2LD_{50}$ TT preinkubiranim predstavljene su isprekidanom linijom. Slika sumira rezultate dobijene u dva nezavisna eksperimenta (10 miševa po grupi u dva eksperimenta; ukupno 20 miševa po grupi). Na slici je predstavljena srednja vrednost inteziteta patologije \pm SE izračunata je za svakog miša u grupi. Dan TT intoksikacije je označen kao 0. dan. Intezitet patologije tokom perioda nakon tretmana praćen je svakodnevno uzimajući u obzir (i) intezitet patologije miševa koji su bili živi u trenutku posmatranja; (ii) miševe koji su uginuli u trenutku posmatranja ili su eutanazirani prethodnog dana (ocene inteziteta patologije date su u odeljku 5.6. In vivo ispitivanja).

Dobijeni rezultati nedvosmisleno pokazuju da se kombinovanjem dva MAAt koja prepoznaju nepreklapajuće epitope TT-a mogu poboljšati vezivne karakteristike pojedinačnih MAAt za TT što za posledicu ima veći zaštitni potencijal BEP u odnosu na istu količinu pojedinačnih MAAt koji ulaze u njegov sastav. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da TT-specifični oligoklonski preparati mogu biti efikasniji u poređenju sa njihovim konstituentima^{13,17,24,109}. Prikazana istraživanja su prvi put pokazala kako promene vezivnih karakteristika TT-specifičnih MAAt usled njihovog kombinovanja utiču na zaštitni potencijal oligoklonskog preparata. Prethodna istraživanja su ukazala da TT-specifična MAAt mogu da ispoljavaju sinergistički efekat *in vivo* kada se primene u vidu oligoklonskih smeša. Volk i saradnici su pokazali da MAAt generisana u mišu nakon imunizacije TTd-om mogu da vezuju oko 20 različitih epitopa i da simultano vezivanje dva MAAt specifična za nepreklapajuće epitope može da obezbedi i do 200 puta bolju zaštitu od intoksikacije u odnosu na odgovarajuća pojedinačna MAAt¹⁷. Takođe, rađena je *in vitro* karakterizacija 11 mišjih TT-specifičnih MAAt, određivan je njihov protektivni kapacitet i za pojedina MAAt je pokazan *in vivo*

sinergizam kada su primenjeni u formi biklonalnih preparata¹⁰⁹. Slično dizajnirano istraživanje, koje je rezultovalo istim zapažanjem, je sprovedeno i sa humanim anti-TTd/TT antitelima^{13,22}. Međutim, ni u jednom od prethodno navedenih istraživanja nisu ispitane osobine vezivanja oligoklonskih preparata / BEP za koje je pokazano poboljšanje *in vivo* zaštitnog potencijala. Sa druge strane, u cilju selektovanja odgovarajućih scFv za dobijanje TT-specifičnih himernih bi-specifičnih helirajućih fragmenata (engl. *chelating recombinant antibodies* - CRAb), rađena je uporedna *in vitro* analiza vezivanja pojedinačnih scFv i odgovarajućih CRAb za TT. Na osnovu pozitivnog kooperativnog efekta koji je pokazan kod određenog broja CRAb pretpostavljeno je da bi oni mogli imati bolji zaštitni potencijal od scFv od kojih su sačinjeni, ali njihov zaštitni potencijal CRAb nije pokazan *in vivo*¹⁶.

4.3 Heterologa imunost pokrenuta imunizacijom tetanus toksoidom: okularne hlamidijalne infekcije

Pretpostavka da bi heterologa imunost pokrenuta imunizacijom TTd-om mogla doprinositi otpornosti ka okularnim hlamidijalnim infekcijama proističe iz činjenice da drastično smanjenje incidence okularnih hlamidijalnih infekcija u razvijenim zemljama koincidira sa uvođenjem imunizacije TTd-om u redovan program vakcinacije tj. omasovljenjem imunizacije protiv tetanusa^{56,71,110}.

4.3.1. Strukturna sličnost TT i proteina bakterija iz roda *Chlamydia*

S obzirom da se imunost protiv tetanusa zasniva na uspostavljanju TT-specifičnog humoralnog imunskog odgovora, a imajući u vidu i činjenicu da uloga At u otpornosti ka hlamidijalnim infekcijama, iako nije primarna, nije zanemarljiva, pretpostavili smo da bi u slučaju okularnih hlamidijalnih infekcija glavni nosioci heterologih efekata vakcinacije TTd-om mogla biti unakrsno reaktivna anti-TTd/TT At. Pošto unakrsna reaktivnost At podrazumeva određeni stepen strukturne homologije epitopa heterologih antigena, pomoću alatki i podataka dostupnih na *online* serveru BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*)^{111,112} ispitano da li i u kojoj meri postoji strukturna sličnost između TT-a i hlamidijalnih proteina za koje je pokazano da su IgG-imunoreaktivni antigeni (**Tabela 4.7**)^{85,113–122}.

Poređenje je rađeno na nivou kratkih peptidnih sekvenci (do 100 ak) i u **Tabeli 4.7** su prikazane S (engl. *score*) i E (engl. *expected value*)^{111,112} vrednosti za hlamidijalne aminokiselinske sekvence sa najboljim preklapanjem sa aminokiselinskom sekvencom TT-a, kao i dužina peptidne sekvence i region TT na kome je maksimalno preklapanje.

Tabela 4.7. Analiza strukturne homologije hlamidijalnih proteina i tetanus toksina na nivou kratkih peptidnih sekvenci.

Hlamidijalni antigeni	serovar	ID brojevi i UniProt baze	Molekulska masa (kDa)	Max score	E vrednost	Dužina peptidne sekvence (broj AK)	Region TT sa maksimalnim preklapanjem
Pmp C ^{79,114,123}	Ct	Q6HA51	188,1	25,0	0,071	84	HC
Pmp D ¹¹⁷	CtD*	O84818	160,7	20,0	1,9	40	LC
Pmp H ¹¹⁷	Ct	Q2TCH7	105,6	18,1	4,3	37	HC
Omc B ^{115,120,124}	CtC *	P26758	58,6	19,6	0,86	61	HC
HSP60 ^{115,119}	CtA *	Q3KMQ9	58,1	17,3	3,6	18	LC
MOMP ^{115,122,125,126}	CtA*	P23732	42,9	16,9	3,3	17	HC
MOMP B ^{79,80,126-129}	CtB*	P23421	42,5	24,6	0,016	60	HC
MOMP C ^{126,130,131}	CtC *	P08780	42,9	17,7	2,0	30	HC
MOMP Cc ^{132,133}	Cc*	Q824U2	41,9	16,9	3,6	9	HC
MOMP D ¹²⁶	CtD*	Q46409	42,5	19,2	0,79	66	HC

Parametri u online serveru BLASTp su podešeni automatski: General Parameters: Max target sequences 100; Expect threshold - 10; Word size - 3; Max matches in a query range - 0; Scoring Parameters: Matrix - BLOSUM62, Gap Costs - Existence 11 Extension 1, Compositional adjustments - conditional compositional score matrix adjustment. Proteinske sekvence koje su recenzirane označene su *.

Dobijeni rezultati pokazuju da je najbolje preklapanje aminokiselinske sekvence TT-a i hlamidijalnih proteina: polimorfnog membranskog proteina C (PmpC) i glavnog proteina spoljašnje membrane (engl. *Major Outer Membrane Protein*; MOMP) izolovanog iz *C.trachomatis* serovar B (MOMP-B). Poređenjem aminokiselinskih sekvenci PmpC vs TT uočeno je da postoji 4 preklapanja na nivou kratkih peptidnih sekvenci i da je najbolje preklapanje PmpC sekvence dužine 84 ak ostatka sa sekvencom u okviru teškog lanca TT. E vrednost za dato preklapanje iznosi 0,071 (**Slika 4.13A**). Poređenjem aminokiselinskih sekvenci MOMP-B vs TT dobijena je E vrednost 0,016 (**Slika 4.13B**) za peptidnu sekvencu MOMP-B dužine 60 ak ostatka sa peptidnom sekvencom teškog lanca TT.

A)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
25.0 bits(53)	0.071	Compositional matrix adjust.	23/84(27%)	35/84(41%)	14/84(16%)

```

Query 458 SLTDLGGELCIKIKEDLTFIAEKNSFSEEPFQDEIVSYNTKMKPLNFNYSLDKIIIVDYN 517
S D+GG LC+ E + F A + S YN+ K +S K + N
Sbjct 563 SSQDVGGLCL---TESVEFDAIGSLLSH-----YNSARKEGGAIHS--KIVILSN 608

Query 518 LQSKITLNDRTTFVTKGIPYAE 541
L+S T ++ ++ P AEE
Sbjct 609 LKSTFTFADMTVKQIVESTPEAE 632

```

B)

Download Graphics Sort by: E value Next Previous Descriptions

sp|P23421|MOMP_B_CHLTH Major outer membrane porin, serovar B OS=Chlamydia trachomatis GN=ompA PE=2 SV=1
Sequence ID: Query_230509 Length: 394 Number of Matches: 3

Range 1: 291 to 349 Graphics Next Match Previous Match Related Information

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
24.6 bits(52)	0.016	Composition-based stats.	17/60(28%)	28/60(46%)	1/60(1%)

```

Query 613 LQWVRDIIDDFINNESSQKTIIDKISLVSILVPPYIGPAINIVKQSYEGNFIGALEITIGVWL 672
      ++R R D T + Q + + I DV+T+ P I A + VR EG ++ + L
Sbjct 291 VKWSRASFADATIRIAQPKSAETIFDVITLNPITAGAGD-VKTSREGQLGDTNQIVSLQL 349
  
```

Slika 4.13. Strukturna homologija hlamidijalnih proteina (pmpC i MOMP-a iz serovara CtB) i tetanus toksina na nivou kratkih peptidnih sekvenci. Poređenje aminokiselinskih sekvenci rađeno je pomoću alati i podataka dostupnih na online serveru BLASTp. Najveće preklapanje aminokiselinske sekvence TT (Sbjct) i aminokiselinskih sekvenci: (A) PmpC i (B) MOMP-B (Query). Na slici su označene crvenom bojom polarne naelektrisane ak, narandžastom su polarne nenaelektrisane, dok su plavom bojom označene ak koje mogu da čine hidrofobno jezgro.

Postojanje strukturne homologije na nivou kratkih peptidnih sekvenci TT i određenih hlamidijalnih proteina ukazuje na mogućnost da dotični hlamidijalni proteini budu prepoznati od strane TT-specifičnih antitela koja se sekretuju nakon vakcinacije protiv tetanusa. Sličnost u aminokiselinskoj sekvenci ukazuje na mogućnost da na površini TT i hlamidijalnih proteina mogu postojati isti / vrlo slični (konformacioni) epitopi^{37,134,135}.

Dobijeni rezultati ukazuju da je dužina peptidnih sekvenci sa najboljim preklapanjem >60 aminokiselinskih ostataka, a zastupljenost identičnih aminokiselinskih ostataka manja od 30%. Ovaj rezultat, posmatran izolovano, ne umanjuje mogućnost prepoznavanja hlamidijalnih antigena od strane unakrsno-reaktivnih anti-TTd/TT At jer je poznato da At prvenstveno prepoznaju konformaciju tj. 3D strukturu antigenog epitopa koja omogućava specifično uspostavljanje vodoničnih, hidrofobnih i elektrostatičkih interakcija sa paratopom At^{134,135}. Drugim rečima, interakcije unakrsno-reaktivnih At sa epitopima heterologih antigena su dominantno posledica elektrostatičke i hidrofobne homologije ciljnih epitopa koja ne zahteva identičnost aminokiselinskih sekvenci nego prisustvo amino kiselina sličnih karakteristika na određenim pozicijama u sekvenci^{111,136-138}. Ispitivanje doprinosa pojedinačnih aminokiselinskih ostataka protein-protein interakcijama pokazalo je da se centar epitopa najčešće sastoji od hidrofobnih amino kiselina, dok se naelektrisani aminokiselinski ostaci nalaze na obodu. Hidrofobni aminokiselinski ostaci u centru epitopa posreduju i omogućavaju formiranje kompleksa, dok naelektrisani/hidrofilni

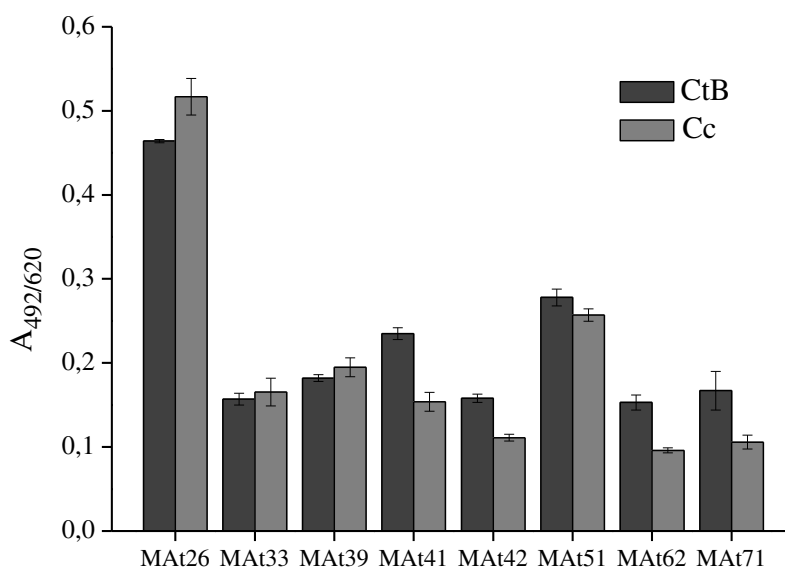
ostaci „uklanjaju“ molekule vode sa dodirne površine Ag-At i formiraju elektrostatičke interakcije i vodonične veze sa odgovarajućim aminokiselinskim ostacima iz paratopa omogućavajući specifično prepoznavanje antitelo-antigen^{134,136-138}. Osim toga, u razmatranju fenomena ukrštene reaktivnosti treba uzeti u obzir činjenice da hipervarijabilnost paratopa (CDR3 regiona) i konformacione promene koje nastaju pri interakciji Ag-At omogućavaju antitelima prepoznavanje veoma različitih površina antigena i u osnovi su prirodne strategije da limitirani repertoar At prepoznaje naizgled beskonačane varijacije proteinskih antigena¹³⁵.

Imajući u vidu ulogu pojedinačnih proteina u životnom ciklusu Ct, postojanje strukturne homologije TT sa PmpC i MOMP-B proteinima dodatno ide u prilog pretpostavci da bi heterologa imunost uspostavljena nakon imunizacije TTd-om mogla doprinositi otpornosti ka hlamidijalnim infekcijama. Naime, PmpC je hlamidijalni adhezin koji se eksprimira i na retikularnom i na elementarnom telu tokom bifaznog životnog ciklusa *Chlamydiae*¹¹⁶ i neophodan je za inicijanu interakciju sa ćelijom domaćina^{114,116,139}. Stoga se može očekivati da PmpC-specifična antitela spreče / otežaju inicijalni kontakt *Chlamydiae* sa ćelijom domaćina i na taj način spreče nastanak i širenje infekcije. U prilog ovoj činjenici idu i rezultati naših prethodnih istraživanja u okviru kojih smo pokazali da nakon konjunktivalne imunizacije zamorčiča bakterijskim *ghost*-ovima probiotske bakterije *Escherichia coli* Nissle 1917 na kojima je eksprimiran N-terminalni domen PmpC dolazi i do povećanja nivoa NPmpC- specifičnih IgA u suzama i smanjenje inteziteta patologije u okularnoj hlamidijalnoj infekciji zamorčiča¹³⁹.

S druge strane, MOMP je najzastupljeniji na površini na Ct. MOMP pripada klasi porina i neophodan je za pasivan transport jona, šećera i nukleotida kroz spoljanju membranu gram negativnih bakterija¹⁴⁰. Brojna istraživanja ukazuju da je MOMP jak imunogen i da bi morao bi biti jedan od antigena u sastavu buduće vakcine protiv hlamidijalnih infekcija^{79,81,85,113,141}.

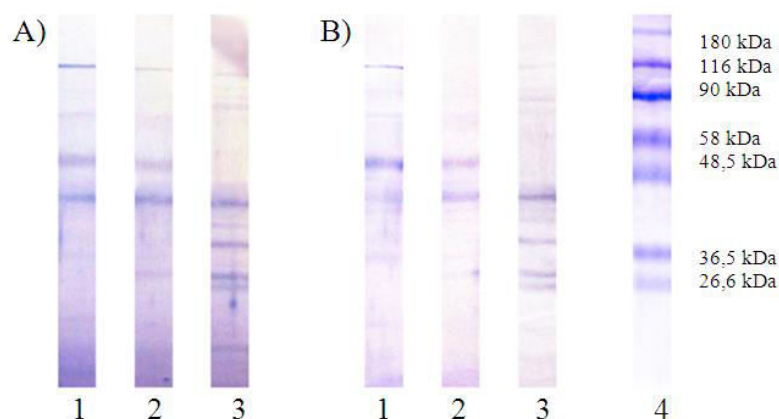
4.3.2 Unakrsna reaktivnost anti-TTd/TT MAAt i hlamidijalnih proteinima

Preliminarno ispitivanje unakrsne reaktivnosti selektovanih anti-TTd/TT MAAt sa proteinima bakterija iz roda *Chlamydia* urađeno je ELISA-om gde su kao antigeni korišćeni *C. caviae*, uzročnik infekcija kod zamorčica, i *C. trachomatis* serovar B (CtB), jedan od uzročnika okularnih infekcija ljudi. Dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 4.14** gde se vidi da u oba slučaja najveću reaktivnost ispoljava MAAt26. Stoga su za dalje analize u ovom delu istraživanja selektovana MAAt26 i MAAt51 na osnovu reaktivnosti ka hlamidijalnim Ag, ali imajući u vidu i njihovu reaktivnost (nizak vs visok afinitet) ka TT-u i zaštitni kapacitet u odnosu na intoksikaciju TT-om.



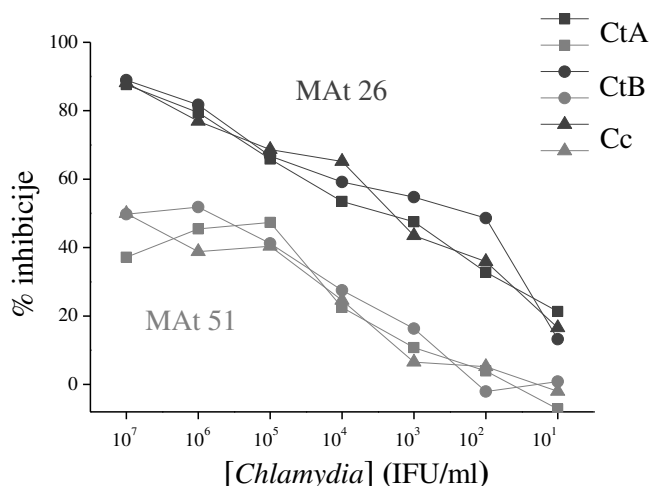
Slika 4.14. Reaktivnost anti-TTd/TT MAAt ka hlamidijalnim antigenima. Sposobnost anti TT MAAt (1 µg/mL) da interaguje sa CtB (10⁶ IFU/mL) i Cc (10⁶ IFU/mL) adsorbovanim na Maxi Sorp ploču potvrđena je ELISA testom. Svi uzorci su analizirani u triplikatu i rezultati su predstavljani kao srednja vrednost A_{492/620} ± standardna greška.

Western blot analizom je pokazano da i MAAt26 i MAAt51 interaguju sa proteinskim trakama lizata Cc, CtA i CtB (**Slika 4.15**). Dobijeni rezultati pokazuju da oba MAAt interaguju prvenstveno sa trakama molekulske mase ≤ 50 kDa i da u korišćenom sistemu ne postoji značajna razlika u profilima imunoreaktivnosti između MAAt26 i MAAt51.



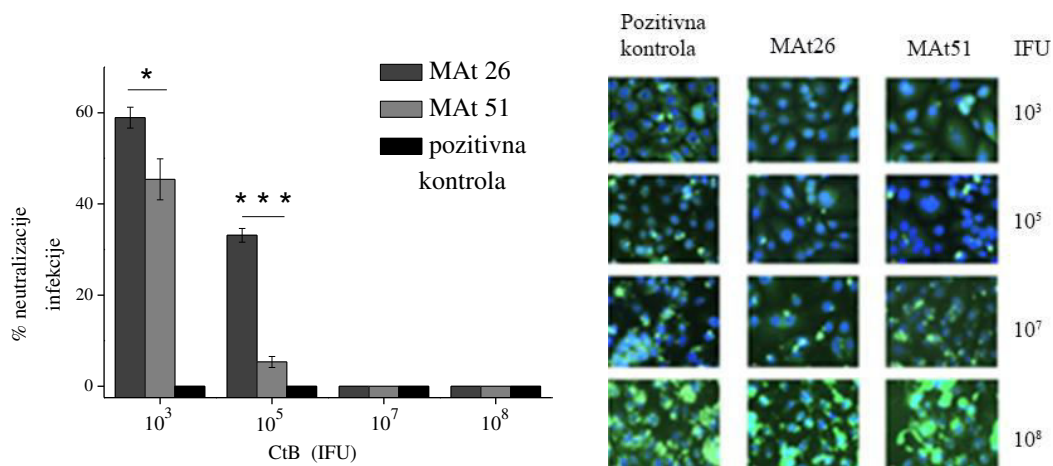
Slika 4.15: Western blot analiza reaktivnosti anti-TTd/TT MAT26 i MAT51 ka hlamidijalnim antigenima. Lizati 1) *C. trachomatis* serovar A; 2) *C. trachomatis* serovar B; 3) *C. caviae* su nakon redukcione SDS-PAGE (9% PAAG, Mini Protean II System, Bio-Rad) transferovani na polivinil difluoridnu membranu. Za vizuelizaciju interakcije A) MAT26 i B) MAT51 (korišćeni u biotinisanoj formi) i hlamidijalnih antigena korišćen je sistem extrAvidin-alkalna fosfataza/NBT/BCIP. Molekulski markeri (High molecular weight molecular markers, Pharmacia) pripremljeni su po preporuci proizvođača (4).

Međutim, rezultati inhibitorne ELISA-e gde je vezivanje MAT26 i MAT51 za adsorbovani TT inhibirano preinkubacijom sa ET Cc, CtA i CtB u rastvoru, ukazali su na razlike u funkcionalnim karakteristikama MAT26 i MAT51 u slučaju hlamidijalnih infekcija. Dobijeni rezultati ukazuju na bolji neutralizacioni kapacitet MAT26 u odnosu na MAT51. Činjenica da je preinkubacija sa istom količinom hlamidijalnih ET značajno više inhibirala vezivanje MAT26 za adsorbovani TT ukazuje da MAT26, u odnosu na MAT51, uspostavlja jače interakcije sa hlamidijalnim ET u rastvoru (**Slika 4.16**). Međutim, definitivni zaključak o odnosu hlamidija-specifičnog neutralizacionog potencijala MAT26 i MAT51 nije mogao biti donet na osnovu ovog testiranja s obzirom da ovakvom rezultatu može doprineti i prethodno pokazana razlika u afinitetima MAT26 i MAT51 ka TT-u.



Slika 4.16. Sposobnost hlamidijalnih ET (CtA, CtB i Cc) da inhibiraju vezivanje anti-TTd/TT MAAt26 i MAAt51 za TT. Rezultati predstavljaju procenat inhibicije vezivanja MAAt26 i MAAt51 ($1 \mu\text{g/mL}$) za TT direktno adsorbovan na Maxi Sorp ploču nakon inkubacije (1h/RT) sa hlamidijalnim ET: CtA, CtB i Cc (10^7 - 10^1 IFU/mL). Procenat inhibicije vezivanja MAAt26 i MAAt51 za TT izračunat je u odnosu na vezivanje MAAt za TT bez prethodne inkubacije sa hlamidijalnim ET (100% vezivanja). Uzorci su analizirani u triplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost % inhibicije \pm standardna greška.

Imajući u vidu prethodno navedene činjenice i želeći da ispitamo neutralizacioni kapacitet selektovanih MAAt u sistemu koji adekvatnije oponaša prirodnu okularnu hlamidijalnu infekciju, ispitana je sposobnost MAAt26 i MAAt51 da inhibiraju *in vitro* infekciju epitelijalnih ćelija humane konjunktive (HcjE) sa CtB ET (Slika 4.17).



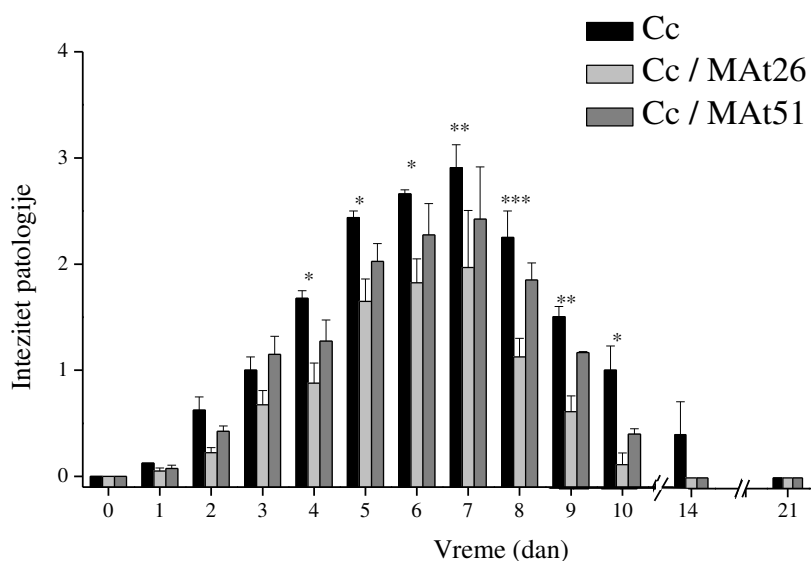
Slika 4.17. Sposobnost anti-TTd/TT MAAt26 i MAAt51 da *in vitro* interferiraju sa hlamidijalnom infekcijom. Sposobnost anti-TTd/TT MAAt26 i MAAt51 da inhibiraju hlamidijalnu infekciju sa CtB ET ispitana je *in vitro* u kulturi HCjE ćelija. HCjE su inficirane CtB ET (koncentracije od 10^3 do 10^8 IFU/bunar) koji je preinkubiran sa MAAt26 i MAAt51 ($5 \mu\text{g/mL}$). Procenat neutralizacije određen pomoću jednačine: $[(\text{broj IFU u ćelijama inkubiranim bez MAAt} - \text{broj IFU u ćelijama inkubiranim sa MAAt}) / \text{broj IFU u ćelijama inkubiranim bez MAAt}] \times 100$. Broj inkluzija je određen nakon bojenja FITC-konjugovanim monoklonskim antitelima specifičnim za LPS Chlamydia pomoću fluorescentnog mikroskopa (Axio-Observer). Akvizicija slike je rađena pomoću TissueFAXS software (Tissuegnostics). Uzorci su analizirani u triplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. Statistički značajna razlika uočena je između MAAt26 i MAAt51 pri infektivnoj dozi 10^3 (* $P < 0,05$) i pri infektivnoj dozi 10^5 (***) $P < 0,001$).

Dobijeni rezultati ukazuju da oba MAt u *in vitro* uslovima interferiraju sa hlamidijalnom infekcijom HCjE ćelija, ali da je MAt26 superiornije. Superiornost MAt26 je posebno došla do izražaja pri povećanju infektivne doze. Izračunati % neutralizacije infekcije HCjE ćelija pokazuje da MAt26 efikasnije sprečava hlamidijalnu infekciju. Pri infekciji HCjE ćelija sa 10^5 IFU CtB, MAt26 je sprečilo infekciju 33,12 % HCjE ćelija dok je u slučaju MAt51 svega 5,33 % HCjE ćelija ostalo neinficirano. Ovaj rezultat, zajedno sa rezultatom inhibitorne ELISA-e, je pokazao da, u poređenju sa MAt51, MAt26 može efikasnije da neutrališe hlamidijalna ET u rastvoru.

4.3.3 Sposobnost anti-TTd/TT MAt da *in vivo* spreče okularnu hlamidijalnu infekciju: model inkluzionog konjunktivitisa zamorčeta

Sposobnost MAt26 i MAt51 da u *in vivo* uslovima interferiraju sa hlamidijalnom infekcijom ispitivana je u modelu inkluzionog konjunktivitisa zamorčeta (okularne infekcije zamorčića sa *C.caviae*) koji se smatra relevantnim modelom za proučavanje okularne hlamidijalne infekcije kod ljudi. Naime, organizacija konjunktivi pridruženog limfoidnog tkiva (CALT; engl. *conjunctiva-associated lymphoid tissue*) zamorčeta, koja je vrlo slična organizaciji CALT-a kod ljudi, činičini model inkluzionog konjunktivitisa zamorčeta najrelevantnijim modelom na životinjama koje ne pripadaju redu Primates.

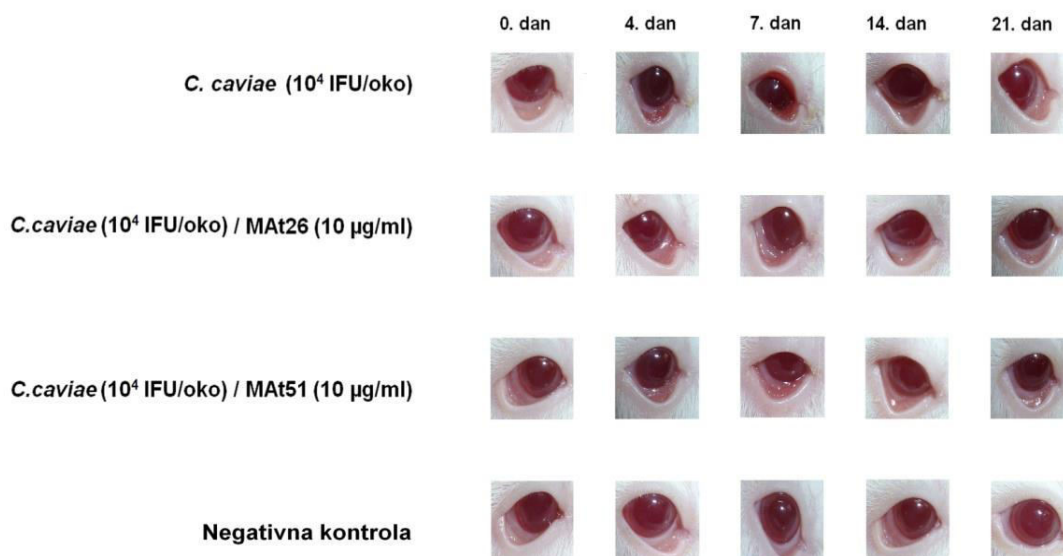
Na **Slici 4.18** prikazane su promene u intezitetu patologije okularne hlamidijalne infekcije zamorčića.



Slika 4.18. Sposobnost anti-TTd/TT MAT da *in vivo* spreče okularnu hlamidijalnu infekciju. Zamorčići (5 zamorčića / grupa) su inficirani sa: 1) Cc (10^4 IFU/oko, pozitivna kontrola); 2) Cc/MAT26 (10^4 IFU/oko Cc preinkubiranom sa MAT26 ($10 \mu\text{g/mL}$) i u akutnoj fazi infekcije (tokom 7 dana od početka infekcije) tretirani sa MAT26); 3) Cc/MAT51 (10^4 IFU/oko) preinkubiranom sa MAT51 ($10 \mu\text{g/mL}$) i u akutnoj fazi infekcije (tokom 7 dana od početka infekcije) tretirani sa MAT51. Dan infekcije je označen kao 0. dan. U definisanim vremenskim intervalima tokom perioda nakon tretmana praćen je intezitet patologije za svakog zamorčića u grupi. Rezultati predstavljaju srednju vrednost inteziteta patologije \pm standardna greška (ocene inteziteta patologije date su u odeljku Eksperimentalni rad). Statistički značajne razlike između Cc (pozitivne kontrole) i Cc/MAT26 uočene su 4., 5., 6. i 10. dana (* $P < 0.05$); 7. i 9. dana (** $P < 0,01$); 8. dana (***) $P < 0,001$).

Pokazano je da lokalno prisutano MAT26 ne može potpuno da spreči okularnu hlamidijalnu infekciju zamorčeta, ali može značajno da ublaži intenzitet patologije u piku bolesti (Slika 4.18; Cc/MAT26 vs. Cc: 4., 5., 6. i 10. dan: $P < 0,05$; 6. i 10. dan $P < 0,01$; 8. dan $P < 0,001$).

Između 2. i 9. dana nakon infekcije, kod zamorčića inficiranih sa 10^4 IFU *C. caviae* preinkubirane sa $10 \mu\text{g/mL}$ MAT26 uočena je blaža klinička slika u poređenju sa zamorčićima izloženim istoj infektivnoj dozi bez MAT ili preinkubiranoj sa MAT51 (Slika 4.19). Takođe, preinkubacija *C. caviae* sa anti-TTd/TT MAT je rezultovala bržom rezolucijom infekcije. Zamorčići tretirani preinkubiranom *C. caviae* sa anti-TTd/TT MAT oporavili su se do 14. dana, za razliku od zamorčića inficiranih samo *C. caviae* koji su se oporavili pri kraju perioda praćenja (20. dan).



Slika 4.19. Reprezentativne fotografije konjunktive zamorčića u definisanim vremenskim intervalima tokom perioda nakon infekcije. Zamorčići tretirani sa anti TTd/TT MAT imaju blažu kliničku sliku okularne hlamidijalne infekcije, za razliku od zamorčića inficiranih samo sa Cc.

U prikazanom setu istraživanja je pokazano da unakrsno-reaktivna At generisana nakon imunizacije TTd-om mogu interferirati sa hlamidijalnim infekcijama tako što ublažavaju kliničku sliku okularne hlamidijalne infekcije. Karakterizacija interakcija ovih MAT sa hlamidijalnim antigenima, pre svega određivanje njihove fine epitopske specifičnosti, mogla bi da doprinese istraživanjima koja su usmerena ka formulisanju vakcine koja će efikasno štititi od hlamidijalnih infekcija. Sa druge strane, definisanje mehanizama koji su u osnovi ove heterologe imunosti moglo bi da doprinese i boljem definisanju mehanizama hlamidijalnih infekcija na specifičnim mukoznim površinama.

Iako MAT26 i MAT51 specifično prepoznaju TT, karakteristike njihovih interakcija sa TT-om se značajno razlikuju kao i njihov zaštitni potencijal. U prethodnom delu istraživanja je pokazano da MAT26 ne obezbeđuje zaštitu od intoksikacije TT-om, dok MAT51 u potpunosti štiti od nastanka tetanusa¹⁰⁴. U kontekstu hlamidijalne okularne infekcije anti-TTd/TT MAT26 koje je nisko afinitetno za TT i ne sprečava nastanak tetanusa je superiornije i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima u odnosu na MAT51 koje u potpunosti štiti od intoksikacije tetanus toksinom.

Ovaj nalaz, zajedno sa rezultatima koji se odnose na formulisanje efikasnih BEP, ide u prilog zapažanju da su prirodni procesi izuzetno kompleksni i vrlo racionalno dizajnirani tokom evolucije, tako da svaki činilac ima svoju ulogu. Tako, nisko afinitetna antitela generisana nakon imunizacije TTd-om, koja ne mogu da obezbede

zaštitu od TT intoksikacije *per se*, mogu da deluju kao pozitivni modulatori vezivanja protektivnih TT-specifičnih At povećavajući njihovu efikasnost i/ili da doprinose otpornosti ka heterologim infektivnim agensima.

5. EKSPERIMENTALNI RAD

5.1 Antitela i antigeni

5.1.1 Proizvodnja MAt u *Integra Cell Line* bocama

Odabrani hibridomi su gajeni u bioreaktorima za jednokratnu upotrebu *CELLine CL 350* (Integra Bioscience AG, Zizers, Švajcarska) koje omogućavaju dugotrajno gajenje hibridoma (broj hibridomskih ćelija može dostići i 10^8 ćelija/mL) i dobijanje supernatanta koji sadrži zadovoljavajuću koncentraciju MAt (5-10mg/mL).

Biorektori su najpre pripremljeni prema preporuci proizvođača, a potom je u deo za zasejavanje dodato 5 mL suspenzije hibridomskih ćelija koncentracije 10^7 ćelija/mL. Hibridomske ćelije su gajene u RPMI-1640 podlozi koji sadrži 10% FCS (eng. *fetal calf serum*), 0,25 % glukoze, 0,03 % L-glutamina, 0,075 % NaHCO_3 i antibiotike Streptamicin (0,1 mg/L) / Penicilin (100 u/L) (SigmaAldrich, Steinhaim, Nemačka). Biorektori su preneti u inkubator u kome su bili podešeni uslovi: 37 °C, 5 % CO_2 , 90 % vlažnost. Supernatanti integre su sakupljeni nakon 7 dana i MAt su izolovana afinitetnom hromatografijom na *HiTrap Protein G* koloni.

5.1.2 Izolovanje MAt afinitetnom hromatografijom na *HiTrap Protein G* koloni

Monoklonska antitela su iz dobijenih supernatanta integre nakon gajenja hibridoma izovolana pomoću afinitetne hromatografije na *HiTrap Protein G* koloni (Pharmacia, Upsala, Švedska).

HiTrap Protein G kolona je najpre preekvilibrisana sa 0,02 M Na_3PO_4 , pH = 7. Pre nanošenja na kolonu u uzorke supernatanta integre su podešeni uslovi 0,02 M Na_3PO_4 , pH = 7, a potom je uzorak nanet na kolonu. Nevezani ili slabo vezani proteini isprani su sa kolone sa 0,02 M Na_3PO_4 , pH = 7. MAt su specifično eluirana sa 0,1 M glicin-HCl, pH = 2,7. Frakcije zapremine 1 mL eluirane su u epruvete u kojima se nalazio 50 μL 1 M Tris, pH = 9. Rastvor Tris-a je dodat u cilju održavanja neutralnog pH i sprečavanja hidrolize MAt na niskom pH. Nakon izolovanja MAt su dijalizovana naspram fosftom puferisanog fiziološkog rastvora (PBS) i određena im je koncentracija merenjem apsorbance na 280 nm. Rastvori MAt / PBS zamrznuti na -20 °C do upotrebe.

5.1.3 Obeležavanje MAt biotinom

Nakon izolovanja pomoću afinitetne hromatografije na *HiTrap Protein G* koloni MAt26, MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71 su dijalizovana naspram 0,1 M NaHCO_3 . U rastvor MAt / 0,1 M NaHCO_3 dodat je NHS-biotin (SigmaAldrich, Steinhaim, Nemačka) prethodno rastvoren u DMSO (10 mg/mL) tako da $m_{\text{MAt}} : m_{\text{NHS-biotin}}$ bude 1 mg : 400 μg . Smeša je inkubirana 4h na ledu uz neprestalno mešanje. Nakon konjugovanja sa biotinom MAt su dijalizovana naspram PBS-a i određena im je koncentracija merenjem apsorbance na 280 nm. Rastvori MAt-B / PBS zamrznuti na -20 °C do upotrebe.

5.1.4 Prečišćavanje TT i TTd hidrofobnom hromatografijom

Polazni materijali za prečišćavanje TT i TTd su nativni TT i TTd preparati dobijeni su u okviru standardnog procesa proizvodnje vakcine protiv tetanus na Instiutu za virusologiju, vakcine i serume – Torlak, Beograd, Srbija. Dobijena su dva uzorka nativnih TT preparata i dva uzorka nativnih preparata TTd-a. Sva prečišćavanja i karakterizacije rađene su za svaki uzorak nezavisno i dobijeni rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti od dva nezavisna uzorka.

Nativni TT preparati su dobijeni tako što su nakon fermentacije *C. tetani* na *Mueller-Miller* podlozi (7 dana, 35 ± 1 °C) bakterijske ćelije filtracijom (0,2 µm veličina pora) odvajene od supernatanta koji sadrži TT. Rastvor nativnog TT je potom tretiran sa formaldehidom (0,35 % w/w, pH=7,4, na 35 ± 1 °C tokom 4 nedelje) dobijen je nativni TTd.

Izolovanje TTd i TT hidrofobnom hromatografijom je rađeno na koloni *Hi Trap Phenyl Sepharose* (unutrašnji prečnik x visina: 1,6 cm x 2,5 cm, 5 mL matriksa; *GE Healthcare*, Upsala, Švedska). Kolona je ekvilibrisana sa 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 3 M NaCl / 0,02 M Na-fosfatnim puferom, pH 7,6. Pre nanošenja na kolonu u uzorke je dodat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (finalna koncentracija 0,5 M) i NaCl (finalna koncentracija 3 M). Nakon nanošenja uzorka kolona je isprana sa 3 M NaCl / 0,02 M Na-fosfatnom puferu, pH 7,6 (5 zapremina kolone (CV) u cilju uklanjanja nevezanih ili slabo vezanih proteina. TT/TTd je eluiran sa 0,02 M Na-fosfatnim puferom, pH 7,6. Koncentracija proteina u sakupljenim frakcijama (1,0 mL) je određena *Bradford*-ovom metodom. Karakteristike prečišćenog TT i TTd proverene su elektroforezom, *Western blot*-om, ELISA-om i specifičnim flokulacionim testom¹⁴² (Prilog 8).

5.1.5 Bakterije iz roda *Chlamydia*

Štokovi bakterija iz roda *Chlamydia* (CtA, CtB i Cc) dobijeni su u okviru standardnog postupka u ćelijskoj kulturi na *McCoy* ćelijama⁷³ u Štokovi bakterija su u SPG puferu (218 mM saharoza, 3,76 mM KH_2PO_4 , 7,1 mM K_2HPO_4 , 4,9 mM kalijum glutamat) zamrznuti na -80 °C do upotrebe.

Za testove unakrsne reaktivnost anti TTd/TT MAt sa hlamidijalnim antigenima korišćeni su lizati bakterijskih ćelija.

Bakterijske suspenzije CtA, CtB i Cc (10^7 IFU/mL, 200 μ L) i *McCoy* ćelija (10^7 ćelija/mL, 200 μ L) su centrifugirane na 25000 g, 1h, na 4 °C. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen, a talog premeren i dodat je rastvor 1% SDS ($m_{(\text{talog})} : V_{(1\% \text{SDS})} = 10:1$). Uzorci su vorteksirani 5 puta 10 sekundi i inkubirani na -20 °C preko noći. Nakon odmrzavanja uzorci su inkubirani u ultrazvučnom kupatilu 3 puta po 5 minuta. Nakon centrifugiranja (14000 g, 10 minuta, 4 °C) dobijeni su supernatanti kojima je najpre bicinhonskom kiselinom određena koncentracija proteina (svi uzorci su podešeni na istu koncentraciju proteina 1 mg/mL) i dalje analizirani elektroforezom i *Western blotom*.

5.2 Određivanje koncentracije proteina

5.2.1 Određivanje koncentracije proteina *Bradford*-ovom metodom

Bradford-ova metoda za određivanje koncentracije proteina je kolorimetrijska metoda koja se zasniva na vezivanju boje *Comassie Brilliant Blue G-250* za protein u kiseloj sredini. Radni rastvor se pravi razblaženjem - koncentrovan rastvor boje (0,5 mg/mL *Comassie Brilliant Blue G-250* / 25 % etanol / 42,5 % H_3PO_4) : destilovana voda = 1 : 4. Uzorci su nanošeni na mikrotitarsku ploču (10 μ L uzorka/bazenu) a zatim je dodat *Bradford*-ov radni rastvori (200 μ L rastvora/bazenu). Kao standard je korišćen goveđi serum albumin (BSA) u rastućim koncentracijama (0 - 500 μ g/mL). Ploče su inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi i očitana je apsorbanca na 580 nm. Koncentracije proteina u uzorcima su preračunate sa standardne krive BSA/PBS.¹⁴³ Ova metoda je korišćena za određivanje koncentracije proteina u uzorcima TT i TTd pre i nakon prečišćavanja.

5.2.2 Kjeldalova metoda za određivanje ukupnog azota i proteinskog azota

Koncentracija ukupnog azota (TN) i proteinskog azota (PN) je određivana Kjeldalovom metodom⁵⁹ u uzorcima TT i TTd pre i nakon prečišćavanja. Koncentracija proteinskog azota određivana je i indirektno deljenjem proteinske koncentracije određene *Bradford*-ovom metodom sa faktorom 6,25.

5.2.3 Određivanje koncentracije proteina merenjem apsorbance na 280 nm

Koncentracije MAt nakon izolovanja određivane su merenjem apsorbance na 280 nm i primenom *Lambert-Beer-ov zakona*. Za izračunavanje koncentracije (mg/mL) za mišji IgG korišćen je apsorpcioni koeficijent 1,43¹⁴⁴.

5.2.4 Određivanje koncentracije proteina bicinhonskom kiselinom

U uzorcima ćelijskih lizata bakterija iz roda *Chlamydia* određivana je koncentracija proteina komercijalno dostupnim reagensima *Pierce BCA protein assay kit* (Thermo Scientific, Rockford, SAD). Ukratko, reagens A (natrijum bikarbonatni pufer, bicinhonska kiselina, natrijum tartarat, 0,1 M natrijum hidroksid) i reagens B (4% bakar sulfat) su neposredno pre uporebe promešani ($V_{(\text{reagens A})} : V_{(\text{reagens B})} = 50:1$), a potom pomešani sa uzorkom ($V_{(\text{reagensi A/B})} : V_{(\text{uzorak})} = 1:20$), inkubirani 30 minuta na 37 °C u vlažnoj komori. Kao standard je korišćen goveđi serum albumin u rastućim koncentracijama tretiran na isti način kao i ispitivani uzorci. Nakon inkubacije izmeran je apsorbance na 545 nm (A_{545}) i sa dobijene standardne krive preračunata koncentracija uzoraka.

5.3 Elektroforeza i *Western blot* analiza

Čistoća izolovanih preparata TT/TTd, izolovanih MAt i očuvanost njihove sposobnosti da interaguju sa TT/TTd biće proveravane elektroforezom i *Western blot* analizom, kao i unakrsna reaktivnost ka proteinima bakterija roda *Chlamydia*.

5.3.1 Natrijum dodecil sulfat- poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Uzorci TT-a i TTd-a, kao i uzorci lizata bakterija iz roda *Chlamydia* su analizirani SDS-PAGE elektroforezom u redukujućim i neredukujućim uslovima sa jednim od dva sistema:

a) Phast System (Pharmacia, Uppsala, Švedska), na komercijalno dostupnim gradijentnim poliakrilamidnim gelovima (4–15 %);

Postupak je izvođen prema uputstvu proizvođača. Ukratko, uzorci su pripremani koristeći *stock* rastvore 10 mM Tris/1 mM EDTA (pH = 8) i 10 % SDS, tako da finalno budu 1 mM Tris / 100 μ M EDTA / 2,5 % SDS. U uzorke koji su analizirani pod redukcionim uslovima dodavan je uzorci β -merkaptoetanol finalne koncentracije 5 % i uzorci su 5 minuta inkubirani na 100 °C.

Ova metoda je korišćena za elektroforetsku analizu uzoraka TT pre i nakon prečišćavanja HIC-om.

b) Mini Protean II System (Bio-Rad, USA), u neredukujućim i redukujućim uslovima na 9 % ili 7 % poliakrilamidnom gelu za razdvajanje i 4 % gelom za koncentrovanje rađena za analizu uzoraka TT i TTd pre i nakon prečišćavanja, kao i lizata bakterija iz roda *Chlamydia*.

Potrebni *stock* rastvori za pripremu gelova su: 30 % akrilamid/bis-akrilamidni rastvor (30 % (w/v) akrilamida/H₂O i 3 % (w/v) bis-akrilamid/H₂O), 1,5 M Tris/HCl (pH = 8,8), za gel za koncentrovanje 0,5 M Tris/HCl (pH = 6,8), 10% amonijum persulfat (APS), 10% SDS (w/v) (natrijum dodecilsulfat), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin). Gelovi za koncentrovanje i razdvajanje pripremljani na osnovu proračuna za 10 mL X % gela:

- 30 % akrilamida X/3 mL

- pufer za odgovarajući gel 2,5 mL
- H₂O (7.5 – X/3) mL
- 10 % APS 50 µl
- TEMED 5 µl (10 µl ako je X > 8%)

Uzorci su pripremani koristeći *stock* rastvori 0,5 M Tris/HCl (pH = 6,8), 85 % glicerol, 1 brom-fenol plavo, 10 % SDS, 14,34 M β-merkapt-etalol, tako da finalno budu 62,5 mM Tris/HCl / 10 % glicerol / 0,02 % brom-fenol plavo / 2% SDS, za postizanje redukujućih uslova dodat β-merkapt etanol (finalna koncentracija 5 %). Pre nanošenja na gel uzorci bez β-merkapt-etalola su inkubirani 5 min na 70 °C, a uzorci u koje je dodat β-merkapt-etalol su inkubirani 5 min na 100 °C. Na gel je nanošeno ~20 µl uzorka. Elektroforeza je rađena u 0,025 M Tris/HCl / 0,192 M glicin / 0,1% SDS puferu pH= 8.3 na *Mini Protean II System* (Bio-Rad, SAD). Uzorci su koncentrovani tokom prolaska kroz gel za koncentrovanje i napon je bio 80 V, nakon čega su proteini u njima su razdvajani na osnovu molekulske mase tokom prolaska kroz gel za razdvajanje pri naponu od 120 V.

5.3.2. Bojenje gelova

Gelovi su bojeni *Coomasie brilliant blue R-250* bojom (LKB Pharmacia). Nakon elektroforeze gel je potapan u rastvor 0,1 % CBB R250 / 50 % metanol / 10 % sirćetna kiselina 20 minuta. Nakon odlivanja boje gelovi su ispirani dva puta po 30 minuta u rastvoru 50% metanola / 10% sirćetna kiselina. Rastvoru su potom odbojeni do potpune eliminacije nespecifičnog bojenja u rastvoru 5% metanol / 10% sirćetna kiselina.

5.3.3 Western blot analiza

Western blot analizom pokazana je reaktivnost selektovanih MAt sa lakim (L) ili sa teškim lancem TT, kao i unakrsna reaktivnost anti-TTd/TT MAt sa proteinima bakterija iz roda *Chlamydia*.

Po završetku SDS-PAGE na *Mini Protean II System*, gel je izvađen iz staklenih ploča i potopljen u pufer za blot koji sadrži 25 mM Tris (SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg, Nemačka) / 193 mM glicin (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka) / 20 % metanol (Fluka), pH=8,3. 0,2 mm nitrocelulozna membrana (NC2, SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg, Nemačka) je najpre hidratizirana kratkotrajnim potapanjem u destilovanu vodu, a potom su gel i membrana postavljeni u "sendvič" između filter papira prethodno dobro natopljenih puferom za blot. "Sendvič" je postavljen u aparat za elektrotransfer tako da nitrocelulozna membrana bude bliža anodi. Elektrotransfer proteina se odvijao 1 h pri konstantnoj struji 1-1.5 mA/cm² (Multiphor II System, LKB, Švedska).

Nakon završenog elektrotransfera rađeno je razvijanje blota. U cilju sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela membrana je najpre saturirana sa 3% BSA (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka) u PBS-u 2h na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4 °C. Zasićena membrana je inkubirana sa rastvorom biotim obeleženih MAT razblaženo u 1% BSA/PBS koncentracije 2 µg/mL, 1h na sobnoj temperaturi. Potom je membrana inkubirana sa extrAvidin- alkalna fosfatazom (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka) razblaženoj prema uputstvu proizvođača. Nakon svakog koraka membrana je isprana 4 puta po 3 minuta sa 0,05 % Tween 20 (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka) / PBS. Vezivanje antitela je vizuelizovano sa *nitro blue tetrazolim* / 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfatom (BCIP/NBT; SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka). Razvijanje boje je prekinuto potapanjem membrane u 0,02M Tris / 5 mM EDTA pH = 7,5. Membrana je potom isprana vodom i osušena.

5.4 *In vitro* ispitivanje vezivnih karakteristika MAt primenom ELISA testa

Ispitivanje vezivnih karakteristika MAt obuhvataće određivanja:

- reaktivnosti ka TT-u i TTd-u
- pozicije epitopa koji prepoznaju anti-TTd/TT MAt u molekuli TT-a, sposobnosti MAt da vežu TT u rastvoru i spreče vezivanje TT za gangliozid (G_{D1b})
- afiniteta i brzine uspostavljanja interakcije anti-TTd/TT MAt / TT,
- ispitivanje da li selektovana MAt mogu simultano da interaguju sa TT i da li pri tome dolazi do uzajamnog uticaja.
- unakrsne reaktivnosti anti-TTd/ TT MAt ka proteinima bakterija iz roda *Chlamydia*

Zajednički koraci za sve ELISA testove najpre podrazumevaju adsorpciju antigena određene koncentracije u zavisnosti od tipa ELISA testa (50 μ L / bunaru, na 4 °C, preko noći) na mikrotitar ploču (MaxiSorp ili PolySorp, Nunc, Roskilde, Danska). Nakon adsopcije Ag ploče su saturisane rastvorom 1 BSA/PBS (w/v) (200 μ L/bunaru, 2 h, sobna temperatura) kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje. U rastvoru 1% BSA / PBS pravljena su razblaženja seruma, MAt, komercijalno dostupnih At specifičnih za mišje imunoglobuline i enzimi korišćeni u detekciji. Komercijalna antitela, kao i enzimi razblaživani su prema uputstvu proizvođača. Svaki od ovih inkubacionih koraka (50 μ L / bunaru, 1 h, sobna temperatura) je praćen ispiranjem rastvorom 0,05 % Tween 20 / PBS (4 x 200 μ L/bunaru). Sistem extrAvidin-peroksidaza (SigmaAldrich, Steinhaim, Nemačka) / o-fenilendiamin (OPD (SigmaAldrich, Steinhaim, Nemačka); 1 mg/mL u 0,05 M limunska kiselina / 0,1 M Na_2HPO_4 / 0,01% H_2O_2 , pH = 5; 50 μ L/bunaru) je korišćena za vizuelizaciju. Nakon prekidanja peroksidazom katalizovane transformacije OPD-a dodatkom 2 M H_2SO_4 (50 μ L/bunaru) očitavana je apsorbancija na 492 nm i 620 nm ($A_{492/620}$).

Specifičnosti pojedinačnih ELISA su navedene u daljem tekstu.

5.4.1 Određivanje imunogenosti TTd-a

Za određivanje imunogenih karakteristika TTd preparata korišćena je kompetitivna ELISA. Na mikrotitarsku ploču (MaxiSorp) je adsorbovan TT (2 µg/mL). Nakon zasićenja na ploču su dodati uzorci koji sadrže TTd preparate u rastućim koncentracijama pomešane sa 0,1 IU/mL standardnim humanim anti-tetanusnim imunoglobulinima (*1st International Standard for Tetanus Immunoglobulin, NIBS code TE-3; NIBS, Potters Bar, UK*). Vezivanje IgG-a standardnog seruma je detektovano biotin obeleženim anti-human IgG antitelima (Sigma). Rastvori koji su sadržali samo standardni humani anti-tetanusni serum u rastućim koncentracijama (od 0,1 IU/mL) su tretirani na isti način i korišćeni su kao standard pomoću kog je izračunat procenat inhibicije svakog uzorka.

5.4.2 Reaktivnosti selektovanih MAt ka TT i TTd

Na mikrotitar ploču adsorbovan je antigen (1 µg/mL TT odnosno 1 µg/mL TTd). Nakon saturacije dodata su MAt u rastućim koncentracijama od 0,01 - 5 µg/mL MAt. Za detekciju vezanih MAt korišćen je anti-mišji IgG obeležen biotinom (Sigma Aldrich).

Reaktivnosti selektovanih MAt ka TT i TTd određena je sa grafika $A_{492/620} = f$ (različite koncentracije vezanih MAt).

5.4.3 Unakrsna reaktivnost anti-TTd/TT MAt ka proteinima bakterija iz roda *Chlamydia*

Sposobnosti anti-TTd/TT MAt da interaguju sa hlamidijanim antigenima analizirana je primenom:

a) Direktna ELISA

Na mikrotitar ploče (MaxiSorp) adsorbovane su bakterije iz roda *Chlamydia* (CtA, CtB i Cc) u koncentraciji 10^6 IFU/mL u PBS-u. Nakon dodavanja uzoraka ploče

su centrifugirane 15 minuta na 800 g. Nakon saturacije ploče sa adsorbovanim bakterijama su isprane samo PBS-om (4 x 200 μ L / bunaru). Na ploče su naneta MAt u koncentracijama 5 μ g/mL MAt i ploče su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja anti-mišjih IgG obeleženih biotinom i vizuelizacije inetrakcija Ag-At izmerena je $A_{492/620}$.

b) Inhibitorna ELISA

Na mikrotitar ploču (MaxiSorp) adsorbovan je TTd u koncentraciji 1 μ g/mL. Nakon saturacije dodata su uzorci pripremljeni na sledeći način: rastuće koncentracije CtA, CtB i Cc (10^1 - 10^7 IFU/mL u 10 x razblaženjima) su najpre preinkubirane sa MAt26 i MAt51 (u finalnim koncentracijama 1 μ g/mL), a potom nanete na ploče koje su potom inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi. Za detekciju vezanih MAt korišćen je anti-mišji IgG obeležen biotinom (Sigma Aldrich). Merena je apsorbancna na 492/692 nm ($A_{492/692}$). Rastvori koji su sadržali samo MAt u rastućim koncentracijama (0-1 μ g/mL) su tretirani na isti način kao i ostali uzorci i korišćeni su za konstrukciju standardne krive pomoću koji je izračunat % inhibicije za svaki uzorak.

5.4.4 Određivanje pozicije epitopa koji prepoznaju anti-TTd/TT MAt u molekuli TT, sposobnost MAt da vežu TT u rastvoru i spreče vezivanje TT za gangliozid (G_{D1b})

a) Pozicioniranje epitopa na TT-u u odnosu na gangliozid-vezujuće mesto za selektovana MAt

Pozicioniranje epitopa na TT-u u odnosu na gangliozid-vezujuće mesto za selektovana MAt određeno je na osnovu procenata specifičnog vezivanja MAt za TT koji je direktno adsorbovan na ploču (TT sistem; molekuli TT-a su nasumično orjentisani) i na osnovu procenata specifičnog vezivanja MAt za TT koji je prethodno adsorbovan na gangliozide (G_{D1b}) (TT/ G_{D1b} sistem; ista orjentacija TT-a molekula usled njihove interakcije sa G_{D1b} molekulima). Korišćeni ELISA testovi:

1. TT sistem: na ELISA ploče (MaxiSorp) je adsorbovan TT (0,7 μ g/mL)
 2. TT/ G_{D1b} sistem: na ELISA ploče (PolySorp) je adsorbovan G_{D1b} (SigmaAldrich; 10 μ g/mL u etanolu) na sobnoj temperaturi, preko noći. Nakon
-

adsorpcije G_{D1b} , kao i nakon saturacije, ploče su ispirane sa PBS-om (4 x 200 μ L/bunaru). U sledećem koraku dodat je TT (25 μ g/mL). Koncentracija TT koja je korišćena u TT sistemu je utvrđena na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja, a dizajn TT/ G_{D1b} sistema je urađen na osnovu datih rezultata.

Radi poređena vezivanja MAt u oba sistema potrebno je adsorbovati isti koncentraciju TT. Za određivanje koncentracije vezanog TT-a korišćen je anti-TTd/TT konjski poliklonski serum (konjski tetanus-antitoksin; Institut za virusologiju, vakcine i serume - Torlak, Beograd, Srbija) koji sadrži antitela specifična za različite epitope i omogućavaju detektovanje svih TT molekula. Tokom pripreme TT/ G_{D1b} sistema (adsorpcija G_{D1b} na PolySorp ploču, saturacija, vezivanje TT-a) paralelno je na MaxiSorp ploču direktno adsorbovan TT u različitim koncentracijama i tretiran kao što je prethodno opisano za TT sistem. Nakon adsorpcije G_{D1b} i TT-a, saturacije i vezivanja TT za G_{D1b} obe ploče su istovremeno tretirane sa konjskim tetanus antitoksinom, a potom anti-konjskim IgG obeleženim biotinom (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka), extrAvidin peroksidazom i OPD-om. Koncentracija vezanog TT-a u TT/ G_{D1b} sistemu je određena sa standardne krive $A_{492/620} = f$ (koncentracije TT) sa TT sistema (određena koncentracija 0,7 μ g/mL). Preciznost je još jednom potvrđena u testu gde su MaxiSorp i PolySorp ploče pripremljene kao što je opisano za TT/ G_{D1b} i TT sisteme i simultano su razvijani sa konjskim tetanus antiserumom, biotinom obeleženim anti-konjski IgG i extrAvidine-peroksidaza/OPD i $A_{492/620}$ su zabeležene za oba sistema.

Svi sledeći koraci su identični za oba sistema: dodavanje MAt (10 μ g/mL); detektovanje vezanih MAt pomoću anti-mišjih IgG obeleženog biotinom; vizuelizacija i dobijanje $A_{492/620}$.

Koncentracija 10 μ g/mL MAt je odarbarna da bi detektovalo i najmanje vezivanje MAt u TT/ G_{D1b} sistemu.

b) Inhibicija vezivanja TT za G_{D1b}

Procena sposobnosti pojedinačnih MAt (MA_{t26}, MA_{t33}, MA_{t39}, MA_{t41}, MA_{t42}, MA_{t51}, MA_{t62} i MA_{t71}) i biklonalnih ekvimolarnih preparata MAt (MA_{t33}/MA_{t39}, MA_{t33}/MA_{t51}, MA_{t33}/MA_{t71}, MA_{t39}/MA_{t51}, MA_{t39}/MA_{t71} i MA_{t51}/MA_{t71}) da *in vitro* inhibiraju vezivanje TT za G_{D1b} rađena je pomoću ELISA testa.

Na ELISA ploče (PolySorp) je adsorbovan G_{D1b} (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka; 10 $\mu\text{g/mL}$ u etanolu) na sobnoj temperaturi, preko noći. Nakon adsorpcije G_{D1b} , kao i nakon saturacije, ploče su ispirane sa PBS-om (4 x 200 μL /bunaru).

U sledećem koraku dodat je TT (25 $\mu\text{g/mL}$) i TT prethodno inkubiran sa pojedničnim MAt 1h na sobnoj temperaturi (TT-a 25 $\mu\text{g/mL}$ i MAt 10 $\mu\text{g/mL}$) ili BEP (TT-a 25 $\mu\text{g/mL}$ i BEP (5 $\mu\text{g/mL}$ po MAt)). Koncentracija vezanog TT je određena dodavanjem konjskog antitetanusnog seruma (konjski tetanus-antitoksin; Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd, Srbija), anti konjskog IgG obeleženog biotinom (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka).

Procenat inhibicije vezivanja TT za G_{D1b} pomoću specifičnih monoklonskih antitela je izračunat u odnosu na dobijenu vrednosti $A_{492/620}$ za vezivanje samog TT za G_{D1b} (100% vezivanje).

5.4.5 Određivanje konstante afiniteta interakcije anti- TTd/TT MAt / TT

Za određivanje konstante afiniteta korišćen je ELISA test modifikovan prema *Friguet*-u (1985)¹⁴⁵. Ukratko, nakon adsorpcije TT (1 $\mu\text{g/mL}$) i saturacije, na ploču su naneti uzorci MAt (finalna koncentracija 1 $\mu\text{g/mL}$) kao i BEP MAt (finalna koncentracija 1 $\mu\text{g/mL}$) prethodno inkubirani (1 h, sobna temperatura) sa TT (finalne koncentracije od 3 do 30 $\mu\text{g/mL}$). Rastvor MAt/BEP i TT je nanet na ploču i inkubiran 1h na sobnoj temperaturi.

K_a za vezivanje pojedinačnih MAt i BEP za TT je određeno *Scatchard*-ovom analizom modifikovanoj prema *Stevens*-u (1987)⁹².

Koncentracija MAt koja je korišćena u određivanju K_a (1 $\mu\text{g/mL}$) je uzeta sa krive vezivanja dobijene za svako pojedinačno MAt ($A_{492/620} = f$ (koncentracija MAt) direktnim ELISA testom i kome je TT (1 $\mu\text{g/mL}$) direktno adsorbovan na ploču i MAt su razblažena u opsegu od 0,001 do 2 $\mu\text{g/mL}$. Sa dobijene krive vezivanja određena je koncentracija koja je u gornjem delu linearnog opsega (u cilju da dobijeni rezultati budu iznad limita detekcije). Na krivoj vezivanja uzeli smo koncentracije na gornjem linearnom delu koji je jednak ili nizi od očekivanih vrednosti za konstantu disocijacije ($1/K_a$; *Friguet et al.*, 1985)¹⁴⁵.

5.4.6 Određivanje konstante brzine uspostavljanja interakcije anti-TTd/TT MAt / TT

Nakon adsorpcije TT (1 µg/mL) i saturacije, na ploču su naneti uzorci pojedinačnih MAt u cilju: i) dobijanja standardne krive vezivanja MAt za TT: MAt u opsegu koncentracija 0,5 do 0 µg/mL (u duplim serijskim razblaženjima); ii) vezivanja MAt u različitim vremenskim intervalima: MAt ([MAt]_o; finalne koncentracija 1 µg/mL) u intervalima od 2 minuta u duplikatima je dodavano na ploču (maksimalno vreme vezivanja je 14 minuta na sobnoj temperaturi).

Na osnovu dobijene standardne krive $A_{492/620} = f$ (koncentracija vezanog MAt) izračunata je koncentracija vezanih specifičnih MAt ([MAt]_{vezani}), dok je koncentracija MAt koja je ostala slobodna u rastvoru ([MAt]_{nevezani}) izračunata na kao [MAt]_o - [MAt]_{vezani}. Uzimajući u obzir da je formiranje kompleksa TT / MAt reakcija gde su koncentracije oba reagensa jednake, konstanta brzine asocijacije (k_{on}) je odrađena za svako MAt nakon linearizacije grafika $1/[MAt]_{nevezani} = f(\text{vreme})$.

5.4.7 Određivanje indeksa aditiviteta anti-TTd/TT MAt

U cilju procene simultanog vezivanja selektovanih MAt obeleženih biotinom (MAAt-B) za TT određivan je indeks aditiviteta ELISA testom za MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71. Vezivanje pojedinačnih MAt-B u koncentracijama od 1 ng/mL to 10 µg/mL za TT (1 µg/mL) rađeno je direktnom ELISA-om i na osnovu dobijenih rezultata odabrane su specifične saturacione koncentracije MAt-B (MAAt33-B: 0,1 µg/mL , MAAt39-B: 0,25 µg/mL, MAAt51-B: 0,05 µg/mL i MAAt71-B: 0,25 µg/mL) za dalje određivanje indeksa aditiviteta.

Nakon adsorpcije TT (1 µg/mL) na MaxiSorp ploču i saturacije, dodati su je rastori MAt-B: 1) rastvori pojedinačnih MAt u navedenim koncentracijama; 2) rastvori dva MAt u navedenim koncentracijama. Nakon vizuelizacije i dobijanja $A_{492/620}$ vrednost izračunat je indeks aditiviteta prema formuli: $IA = \{ [A_{MAAtx+MAAby} - (A_{MAAtx} + A_{MAAby})] / (A_{MAAtx} + A_{MAAby}) / 2 \} * 100$.

5.4.8 Određivanje *in vitro* potence BEP

Potenca se često koristi za karakterizaciju i poređenje potence dobijene u *in vitro* testovima ispitivanih uzoraka i poznatog standarda. Izračunava se kao odnos koncentracije standarda potrebne da dovede do 50% maksimalnog efekta (IC_{50} vrednost standarda) i koncentracije ispitivanog uzorka potrebne da dovede do 50% maksimalnog efekta (IC_{50} vrednost uzorka).

Najpre smo ELISA testom odredili koncentracije pojedinačnih MAt i BEP, kao koncentraciju standardnih humanih anti-tetanusnih imunoglobulina (1st International Standard for Tetanus Immunoglobulin, NIBS code TE-3; NIBS, Potters Bar, UK) potrebne da dovedu do 50% maksimalne inhibicije vezivanja TT za G_{D1b} .

Ukratko, na ELISA ploče (PolySorp, Nunc, Roskild, Danska) je adsorbovan G_{D1b} (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka; 10 $\mu\text{g/mL}$ u etanolu) na sobnoj temperaturi, preko noći. Nakon adsorpcije G_{D1b} , kao i nakon saturacije, ploče su ispirane sa PBS-om (4 x 200 μL /bunaru).

U sledećem koraku dodat je TT (25 $\mu\text{g/mL}$) i TT prethodno inkubiran 1h na sobnoj temperaturi sa rastućim koncentracijama: 1) pojediničnih MAt (finalna koncentracija od 0 - 30 $\mu\text{g/mL}$) i 2) BEP: MAt33/MAt39, MAt33/MAt51, MAt33/MAt71, MAt39/MAt51, MAt39/MAt71 i MAt51/MAt71 (finalne koncentracije ekvimolarnih smeša su podešene u opsegu od 0 - 30 $\mu\text{g/mL}$), 3) standardni antiserum TE-3 (finalne koncentracije su podešene u opsegu od 0 - 8 IU/mL). Koncentracija vezanog TT je određena dodavanjem konjskog antitetanusnog seruma, (konjski tetanus-antitoksin; Institut za virusologiju, vakcine i serume - Torlak, Beograd, Srbija).

IC_{50} vrednost izračunata na osnovu sigmoidne dozno-zavisne krive f (log (različite koncentracije At)) = % vezivanja TT za G_{D1b} nakon inkubacije TT sa različitim koncentracijama At. Procenat inhibicije vezivanja TT za G_{D1b} pomoću specifičnih monoklonskih antitela je izračunat u odnosu na dobijenu vrednosti $A_{492/620}$ za vezivanje samog TT-a za G_{D1b} (100% vezivanje). IC_{50} vrednost izračunata pomoću softvera *GraphPad PRISM 5 / Nonlinear Curve Fitting / Dose-response curve (variable slope)*. Potenca je dobijena kao odnos IC_{50} za standardni antiserum TE-3 i dobijenih IC_{50} vrednosti za uzorke MAt.

5.4.9 Kooperativni efekat vezivanja dva MAt

Međusobani uticaj selektovanih BEP na vezivanje za TT urađen je uporednom analizom. Ispitivana MAt (obeležena biotinom (MAt-B) u opsegu koncentracija od 0,03 – 4 $\mu\text{g/mL}$) inkubirana su (1h, RT) sa TT (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ili sa TT preinkubiranim (1h, RT) sa jednim od tri preostala selektovana MAt (0,5 $\mu\text{g/mL}$ TT + MAt 0,5 $\mu\text{g/mL}$; TT/MAb). Nakon inkubacije dodat je saturisani rastvor amonijum sulfata (pH=7) u finalnoj saturaciji 40 % u sve TT/MAt/MAt-B uzorke. Svi uzorci su inkubirani preko noći na 4°C. Precipitirani imunokompleksi su odvojeni centrifugiranjem uzoraka na 20 000 g, 30 minuta. Dobijeni supernatanti su naneti na Maxi Sorp ploču i inkubirani 1h na RT. Nakon inkubacije supernatanta koji sadrže MAt-B i “vizuelizacije” izmerena je $A_{492/620}$. MAt-B u serijskim razblaženjima (od 4 $\mu\text{g/mL}$ do 0,03125 $\mu\text{g/mL}$) direktno su adsorbovana na mikrotitar ploču i tretirana na isti način (inkubacija sa rastvorom amonijum sulfata finalne saturacije 40 %, saturacija sa 1 % BSA/PBS, ispiranje) i korišćena su za dobijanje standardne krive. Dobijeni rezultati vezivanja predstavljeni su u formi *Klotz*-ovih grafikona: procenat vezanog TT = f (log koncentracije slobodnog MAt-B). Koncentracija slobodnog MAt33-B, MAt39-B, MAt51-B i MAt71-B u rastvorima gde je 50% TT vezano (MAt33_{f,50%}, MAt39_{f,50%}, MAt51_{f,50%} i MAt71_{f,50%}) izračunato je pomoću softvera *GraphPad PRISM 5.0 / Nonlinear Curve Fitting / Dose-response curve*.

5.5 Ispitivanje sposobnosti anti-TTd/TT MAt da *in vitro* spreče infekciju HCjE ćelija sa CtB

Sposobnost anti-TTd/TT MAt da inhibiraju sposobnost hlamidijalne infekcije ispitana je *in vitro* u kulturi humanih konjuktivalnih epitelijalnih ćelija (HCjE ćelije).

HCjE ćelije su gajene su u *keratinocyte serum-free* medijumu (Life Technologies, Paisley, UK) na 37 °C / 5 % CO₂ / 95% vlažnost. HCjE ćelija su potom zasejane 7x10⁴ ćelija/bunaru u pločama sa 8 komora (Millipore, Billerica, MA, USA) i inkubirane preko noći radi adhezije. Serijska razblaženja CtB u koncentraciji od 10³ to 10⁸ IFU/bunar su inkubirana sa pojedinačnim MAt26 i MAt51 (5 µg/mL) u SPG 2h na 37 °C. Serijska razblaženja CtB u SPG bez MAt su korišćena kao kontrola. Nakon inkubacije, svi uzorci su centrifugirani na 14.000 rpm, 10 minuta i dobijeni talog je resuspendovan u inokulacionom medijumu (DMEM/Ham's F12, 1:1 supplemented with 25 mM HEPES, Life Technologies, Paisley, UK) i dodat u HCjE kulture. Ploče su centrifugirane 60 minuta na 2000 rpm i dodatno inkubirane 60 minuta na 37 °C. Inokulacioni medijum je zamenjen medijumom koji omogućava rast *Chlamydia* (*keratinocyte serum-free* medijum Life Technologies, Paisley, UK) i ćelije su inkubirane 48 h na 37 °C.

Ćelije su potom fiksirane na ledenom metanolu i bojene FITC-konjugovanim monoklonskim antitelima specifičnim za LPS *Chlamydia* (Clone B410F, Pierce Biotechnology, Rockford IL, USA). 4',6-diamidino-2-phenylindole (1 µg/mL; Sigma Aldrich, St. Louise, MO, USA) je korišćen kao pozadinsko bojenje. Broj inkluzija je određen pomoću fluorescentnog mikroskopa (Axio-Observer, Zeiss, Beč, Austrija). Akvizicija slike je rađena pomoću *TissueFAXS software* (Tissuegnostics, Beč, Austrija).

% neutralizacije određen pomoću jednačine: [(broj IFU u ćelijama inkubiranim bez MAt - broj IFU u ćelijama inkubiranim sa MAt)/ broj IFU u ćelijama inkubiranim bez MAt] x 100.

5.6 *In vivo* ispitivanja

Za sve eksperimentalne procedure sprovedene na životinjama dobijena je dozvola Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Instituta za virusologiju, vakcine i serume - Torlak i od strane Etičkog komiteta za brigu o životinjama Republike Srbije (broj dozvole: 011-00-00510/2011-05/5). Svi eksperimenti urađeni su u skladu sa 3R principom (engl. *Replace, Reduce, Refine*) i regulativom o dobrobiti životinja objavljenoj u Službenom glasniku br. 41/9. Sve životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za virusologiju, vakcine i serume - Torlak u Beogradu. Životinje su imale neograničen pristup hrani i pijaćoj vodi *ad libitum*.

U eksperimentima određivanja dužine poluživota ($t_{1/2}$) MAt u cirkulaciji, kao i u ispitivanjima zaštitnog i terapijskog potencijala anti-TTd/TT MAt i BEP-MAt su korišćene ženke miševa soja *Swiss White*, starosti od 6 do 8 nedelja, težine 20 ± 2 g, 8-10 miševa po grupi.

U ispitivanjima sposobnosti anti-TTd/TT MAt da interferiraju u okularnoj hlamidijanoj infekciji zamorčića korišćene ženke zamorčića soja *Hartley*, starosti od 6 do 8 nedelja težine 300 - 350 g, 5 zamorčića po grupi.

5.6.1 Određivanje dužine poluživota ($t_{1/2}$) MAt u cirkulaciji

Dužina polu-života MAt u serumu je određena indirektno, praćenjem promene nivoa TT specifičnih IgG u serumu miševa tretiranih intravenski (i.v.) rastvorom MAt/PBS.

Za određivanje dužine poluživota ($t_{1/2}$) MAt u cirkulaciji miševima je intravenski (i.v.) ubrizgan rastvor MAt (50 μ g MAt, 100 μ L po mišu, 5 miševa za svako MAt). Koncentracija MAt u mišjem serumu je praćena 7 dana. Sva MAt su ubrizgana u istoj koncentraciji da bi se izbegao uticaj početne koncentracije na $t_{1/2}$ u serumu¹⁴⁶. S obzirom da je reaktivnost IgG sa TT pre tretmana bila zanemarljiva, reaktivnost nakon tretmana je pripisana ubrizganim MAt. Serumi su izdvajani iz uzoraka krvi skupljenih krvarenjem iz repne vene. Prvi uzorak seruma je uzet 8 h nakon ubrizgavanja MAt jer je

pokazano da MAt tada imaju najveću koncentraciju (određeno preliminarnim eksperimentima)³⁵, dok su ostali uzorci sakupljeni u intervalima od 24 h tokom 7 dana.

Koncentracija određenih MAt u uzorcima seruma skupljenih u definisanim vremenskim tačkama detektovana je primenom direktne ELISA. Relativne koncentracije MAt u određenim vremenskim intervalima predstavljene su kao % maksimalnog vezivanja MAt (100% vezivanje) detektovanog u serumima sakupljenim 8 h nakon i.v. tretmana. $t_{1/2}$ je izračunato na osnovu sigmoidne dozno-zavisne krive f (definisani vremenski intervali) = Srednja vrednosti relativnih koncentracija MAt u serumu (SE < 10%) pomoću softvera *Origin 8/ Nonlinear Curve Fitting / Dose-response curve*.

5.6.2 Zaštitni potencijal anti-TTd/TT MAt

Zaštitni potencijal anti-TTd/TT MAt ispitan je *in vivo* testom nakon intoksikacije TT-om na miševima soja *Swiss White*. Eksperimenat je rađen kao dvostruko-slepa (*double-blind*) analiza.

Miševima (10 miševa u grupi) je intraperitonealno (i.p.) ubrizgano 0,5 mL rastvora:

- 2LD₅₀ TT / PBS (pozitivna kontrolna grupa);
- 2LD₅₀ TT / MAt (10 µg/miš) / PBS (grupe: TT/MAt26, TT/MAt33, TT/MAt39, TT/MAt41, TT/MAt42, TT/MAt51, TT/MAt62 i TT/MAt71);
- 2LD₅₀ TT / BEP (po 5 µg/miš svakog MAt) / PBS (grupe: TT/MAt33/MAt39, TT/MAt33/MAt51, TT/MAt33/MAt71, TT/MAt39/MAt51, TT/MAt39/MAt71, TT/MAt51/MAt71);
- PBS (negativna kontrolna grupa).

Svi rastvori su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi pre ubrizgavanja.

Nakon intraperitonealne (i.p.) aplikacije letalne doze TT i letalne doze TT preinkubirane sa odgovarajućim MAt, miševi su posmatrani svakodnevno tokom narednih 15 dana (dan kada su ubrizgani TT i TT/MAt rastvori je označen kao dan 0) i praćen je intenzitet simptoma karakterističnih za tetanus, vreme oporavka i % preživljavanja. Simptomi sistemskog tetanus su ocenjivani po sledećim kriterijumima:

0- nema simptoma tetanusa, 1- blaga ukočenost vidljiva kada se miš podigne, 2- očigledna ukočenost udova, ali se ud koristi pri kretanju, 3- očigledna ukočenost udova, ud je blago pokretan ali nefunkcionalan, 4- vrlo izražena ukočenost udova, 5- uginuli miševi. Takođe, miševi koji su imali ocenu 4 su eutanazirani i sledećeg dana im je bila ubeležena ocena 5. Intezitet patologije, vreme oporavka i % preživljavanja su izračunati za sve miševe u grupi (10 u grupi) (eutanaziranim miševima je zabeležena ocena patologije 5 do kraja perioda praćenja).

5.6.3 Terapeutski potencijal anti-TTd/TT MAt

MAt koja su u prethodnom testu pokazala zaštitni efekat su dalje ispitivana. Cilj je bio ustanoviti terapeutski potencijal datih MAt nakon ubrizgavanja letalne doze TT.

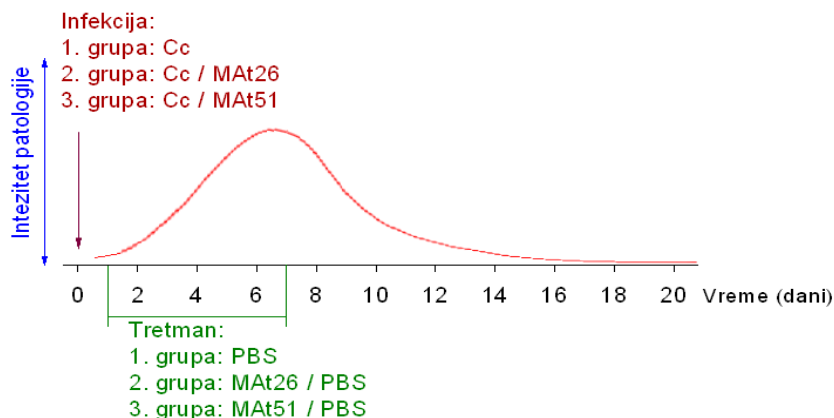
Miševi su tretirani i.p. sa 0.5mL rastvora koji sadrži 2LD₅₀ TT / PBS, a nakon 2 h, 6 h ili 24 h ubrizgano im je 10 µg u 100 µL PBS MAt33, MAt39, MAt51 i MAt71, kao i rastvora ekvimolarne smeše MAt51/MAt71 (5 µg MAt51 i 5 µg MAt71 u 100 µL PBS) u repni venu (i.v.). Miševi su grupisani (8-10 miševa u grupi) prema vremenu aplikacije MAt i vrste MAt. Grupa miševa tretiranih i.p. sa 0,5 mL PBS-a i grupa ne tretiranih miševa su takođe bile uključene u test.

Intezitet patologije, vreme oporavka i % preživljavanja su izračunati za sve miševe u grupi prema istim kriterijumima opisanim u prethodnom odeljku.

5.6.4 Ispitivanje sposobnosti anti-TTd/TT MAt da spreče okularnu hlamidijalnu infekciju zamorčića

Zamorčići su bili podeljeni u grupe (3 zamorčića po grupi). Anesteziranim zamorčićima je direktno na površinu konjunktive aplikovano 25 µL SPG pufera koji sadrži: (i) 1 x 10⁴ IFU *C. caviae* – pozitivna kontrola, (ii) 1 x 10⁴ IFU *C. caviae* preinkubirane sa 10 µg/mL MAb26, (iii) 1 x 10⁴ IFU *C. caviae* preinkubirane sa 10 µg/mL MAb51. Kontrolnoj grupi je apliciran samo SPG pufer. Tokom akutne faze infekcije (7 dana) zamorčići su tretirani odgovarajućim MAt. Dan kada je započet

eksperiment označen je kao dan 0. Praćen je intezitet patologije zamorčića svakodnevno tokom 21 dana, prema ranije uspostavljenim kriterijumima (**Slika 5.1**).



Slika 5.1. Dizajn eksperimenta za određivanje sposobnosti anti-TTd/TT MAT da *in vivo* spreče okularnu hlamidijalnu infekciju. Zamorčići (5 zamorčića / grupa) inficirani su sa: 1) Cc (10^4 IFU/oko, pozitivna kontrola); 2) Cc/MAT26 (10^4 IFU/oko Cc preinkubiranom sa MAT26 ($10 \mu\text{g/mL}$) i u akutnoj fazi infekcije (tokom 7 dana od početka infekcije) tretirani sa MAT26); 3) Cc/MAT51 (10^4 IFU/oko) preinkubiranom sa MAT51 ($10 \mu\text{g/mL}$) i u akutnoj fazi infekcije (tokom 7 dana od početka infekcije) tretirani sa MAT51. Dan infekcije je označen kao 0. dan. U definisanim vremenskim intervalima tokom perioda nakon tretmana praćen je intezitet patologije za svakog zamorčića u grupi.

Tokom 21 dana svakodnevno je praćen je intezitet patologije prema uspostavljenim kriterijumima^{147,148} Na **Slici 5.2** prikazan je intezitet patologije okularne hlamidijalne infekcije zamorčića.



Slika 5.2. Stepen patologije u okularnoj infekciji zamoraca

5.7 Poređenje aminokiselinskih sekvenci

Za poređenje aminokiselinskih sekvenci (ak) korišćen je *online* server BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*)¹¹². Server BLASTp pomoću supstitucionih matriksa omogućava poređenje željene ak sekvence sa ak sekvencama iz baze podataka ili sa odabranom ak sekvencom tako što pronalazi segmente ispitivanih sekvenci sa najboljim preklapanjima.

U okviru BLAST postoje više supstitucionih matriksa. Svaki substitucionni matriks je povezan sa evolutivnom udaljenošću ispitivanih proteina. Najčešće primenjivan je BLOSUM matriks u okviru kog se konzervirani regioni srodnih proteina predstavljaju kao blokovi tj. jedinstvene sekvence u poređenju jer se na taj način se izbegava *over-weighting* proteina iz iste familije. Na primer, upotrebom BLOSUM62 matriksa blokove čine sekvence koje imaju najmanje 62% identičnu sekvencu. Ujedno veći broj BLOSUM matriksa ukazuje na manju evolutivnu udaljenost sekvenci. BLOSUM62 matriks je u osnovi većine aplikacija za poređenje ak sekvence¹¹¹.

BLAST započinje pretragu sličnih sekvenci na osnovu dužine zadate sekvence. Na mestu gde pronade preklapanje sekvenci zadate dužine (engl. *word size*) BLAST dalje poredi sekvence i po potrebi uvodi substituciju (ukoliko su ak u sekvencama slične) ili pukotine (engl. *gap*) u sekvenci (ukoliko su ak u sekvencama razlikuju). Pomoću odabranog substitucionog matriksa svi pomenuti procesi se ocenjuju i za sekvence koje se preklapaju dobijaju se parametri: S (engl. *score*) - predstavlja maksimalnu ocenu odnosno sumu ocena substitucija (aminokiseline istih fizičko-hemijskih osobina imaju pozitivnu ocenu) i ocena pukotina (postojanje pukotine u sekvenci i dužina pukotine ocenuje se negativno) i E vrednost (engl. *expect value*) kojom se procenjuje koliko se preklapanja aminokiselinske sekvenci u datom *score*-u može dogoditi slučajno. Parametri S i E vrednost predstavljaju pouzdanost u preklapanju ispitivanih sekvenci. Što manja E vrednost ukazuje na značajnije preklapanje u sekvenci. Za identične sekvence E vrednost je jednaka nuli¹¹².

5.8 Statistička analiza

Statistički značajna razlika u dobijenim rezultatima u okviru eksperimentalnih grupa je određen pomoću t-testa, kao i pomoću *two way ANOVA* sa post testovima: *Tukey's Multiple Comparison Test* i *Bonferroni post test* uzimajući da je vrednost verovatnoće (P) 0,05 kao granica značajnosti (softveri: *ORIGIN 8.0* i *Prism5/GraphPad*). Korelacija između promenljivih je određena *Pearson*-ovom bivarijantnom korelacijonom analizom gde je određivan *Pearson*-ov korelacioni koeficijent (P_{cc}) (softver: *IBM SPSS Statistics 20*).

6. ZAKLJUČCI

I Zaštitni potencijal anti-TTd/TT antitela može se proceniti na osnovu afiniteta ka TT-u i sposobnosti da inhibiraju TT-G_{D1b} interakciju. TT-specifična antitela koja mogu da spreče *in vivo* intoksikaciju TT-om treba da vezuju TT-om sa afinitetom $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ i da istovremeno imaju sposobnost da inhibiraju vezivanje TT-a za G_{D1b} gangliozide. Afinitet prema TT-u je prvi selekcionni kriterijum zaštitnih TT-specifičnih antitela, a potom njihova sposobnost da preveniraju TT-G_{D1b} interakciju. Zaštitni potencijal TT-specifičnih antitela čiji je afinitet ka TT-u $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ dominantno određuje sposobnost inhibiranja TT-G_{D1b} interakcije a ne sam afinitet. Navedeni opšti zaključak proizilazi iz sledećih zaključaka donetih na osnovu rezultata ovog dela istraživanja:

- 1) Zaštitu od TT-intoksikacije *in vivo* pružaju samo TT-specifična MAt čiji je afinitet za TT jednak ili veći od $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Anti-TTd/TT antitelo, koje vezuje TT sa afinitetom $< 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, bez obzira na sposobnost da pod određenim uslovima *in vitro* spreči uspostavljanje TT-G_{D1b} interakcije, ne obezbeđuje *in vivo* zaštitu od TT intoksikacije.
- 2) Anti-TTd/TT antitela koja vezuju TT sa afinitetom $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ali pri tome ne mogu da spreče uspostavljanje TT-G_{D1b} interakcije, ne obezbeđuje *in vivo* zaštitu od TT intoksikacije.
- 3) Sposobnost TT-specifičnog antitela da interaguje sa TT-G_{D1b} kompleksom ne doprinosi njegovom zaštitnom potencijalu *in vivo*. Šta više, zaštitni potencijal anti-TTd/TT MAt, procenjen na osnovu stepena preživljavanja miševa nakon intoksikacije letalnom dozom TT-a, značajno negativno korelira sa vezivanjem MAt za TT-G_{D1b} kompleks.

- 4) Brzina vezivanja TT-specifičnog antitela za TT ne utiče značajno na njegov zaštitni potencijal procenjen na osnovu stepena preživljavanja *in vivo* intoksikacije letalnom dozom TT-a.
- 5) Afinitet ka TT i sposobnost inhibicije TT-G_{D1b} interakcije zajedno određuju zaštitni potencijal TT-specifičnih antitela jer, posmatrano po pojedinačnim karakteristikama vezivanja, *in vivo* zaštitni potencijal anti-TTd/TT MAt ne korelira značajno ni sa njihovim afinitetom ka TT-u ni sa sposobnošću da spreče uspostavljanje TT-G_{D1b} interakcije. *In vivo* zaštitni potencijal anti-TTd/TT MAt je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa sposobnošću inhibiranja TT-G_{D1b} interakcije samo u slučaju antitela čiji je afinitet ka TT $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

II Kombinovanjem dva TT-specifična MAt koja mogu da istovremeno interaguju sa TT-om i pri tome ispoljavaju pozitivan kooperativni efekat, može se dobiti BEP čiji je zaštitni potencijal bolji u odnosu na MAt koji ulaze u njegov sastav. Povećanje zaštitnog kapaciteta je posledica promena karakteristika vezivanja BEP za TT u odnosu na odgovarajuća pojedinačna MAt u smislu efikasnije inhibicije uspostavljanja TT-G_{D1b} interakcije i rasta prosečnog afiniteta ka TT-u. TT-specifična MAt koja sama ne mogu da obezbede potpunu zaštitu od TT-intoksikacije mogu da budu značajni konstituenti TT-specifičnih BEP u slučajevima kada ispoljavaju pozitivne efekte na vezivanje drugog MAt koji ulazi u sastav datog BEP. Navedeni opšti zaključci proizilaze iz sledećih zaključaka donetih na osnovu rezultata ovog dela istraživanja:

- 1) Pri simultanom vezivanju za TT, može doći do promene afiniteta vezivanja specifičnog anti-TTd/TT MAt za TT u odnosu na situaciju kada ono samostalno interaguje sa TT-om. Uzajaman uticaj MAt je specifičan tj. može rezultovati porastom, ali i smanjenjem afiniteta interakcije u poređenju sa sistemom gde je prisutno samo jedno MAt i TT.
- 2) Kombinovanjem TT-specifičnih MAt može se dobiti BEP čija je *in vitro* potenca veća od potence njenih konstituenata. Što je veći uzajamni pozitivan uticaj MAt na njihovo vezivanje za TT to je porast *in vitro* potence u odnosu na pojedinačna

MAt izraženiji. *In vitro* potencia BEP pozitivno korelira sa njenim afinitetom za TT i sposobnošću da inhibira uspostavljanje TT-GD1b interakcije.

- 3) Kao i u slučaju pojedinačnih MAt, zaštitni potencijal BEP čiji je prosečan afinitet za TT $\geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ primarno je određen sposobnošću BEP da inhibira uspostavljanje TT-G_{D1b} interakcije. Zaštitni potencijal BEP (stopa preživljavanja, smanjenje intenziteta patologije i vremena oporavka) značajno koreliraju sa sposobnošću BEP da inhibira uspostavljanje TT-G_{D1b} interakcije.

III TTd/TT-specifična antitela mogu, usled unakrsne reaktivnosti, interagovati sa hlamidijalnim antigenima i doprineti ublažavanju kliničke slike u slučaju okularne hlamidijalne infekcije. Navedeni opšti zaključak proizilazi iz sledećih zaključaka donetih na osnovu rezultata ovog dela istraživanja:

- 1) Na nivou primarne strukture postoji određen stepen homologije između TT i hlamidijalnih proteina.
- 2) TTd/TT-specifična MAt u direktnoj ELISA-i i pri *Western blot* analizi uspostavljaju interakcije sa hlamidijalnim antigenima.
- 3) Hlamidijalni antigeni mogu da sprečavaju vezivanje TTd/TT-specifičnih MAt26 i MAt51 za TT.
- 4) MAt26 i MAt51 inhibiraju *in vitro* infekciju HCjE ćelija sa CtB. U oba slučaja stepen inhibicije zavisi od CtB doze, pri čemu MAt26 efikasnije prevenira *in vitro* infekciju.
- 5) MAt26 ne može u potpunosti da prevenira okularnu hlamidijalnu infekciju kod zamorčića ali njegova primena tokom akutne faze infekcije značajno ublažava kliničku sliku.

7. LITERATURA

1. Montecucco C, Schiavo G. **Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins.** *Mol Microbiol.* 1994;13(1):1-8.
2. Naghavi M, Wang H, Lozano R, et al. **Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.** *Lancet.* 2015;385(9963):117-71.
3. Gill DM. **Bacterial Toxins: a Table of Lethal Amounts Relevance to Possible Cloning of Genes Coding for Toxins.** *Microbiol Rev.* 1982;46(1):86-94.
4. Taylor AM. **Tetanus.** *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain.* 2006;6(3):101-104.
5. WHO Technical Note. **WHO | Current Recommendations for Treatment of Tetanus during Humanitarian Emergencies.** World Health Organization; 2010.
6. **Tetanus.** In: Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J, editors. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases.* Washington DC: Public Health Foundation, Centers for Disease Control and Prevention, 2012;291–300.
7. Hassel B. **Tetanus: Pathophysiology, Treatment, and the Possibility of Using Botulinum Toxin against Tetanus-Induced Rigidity and Spasms.** *Toxins (Basel).* 2013;5(12):73-83.
8. Saylor C, Dadachova E, Casadevall A. **Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases.** *Vaccine.* 2009;27:G38-G46.
9. European Medicines Agency. **CPMP Note for Guidance on Production and Quality Control of Animal Immunoglobulins and Immunosera for Human Use CPMP/BWP/3354/99.;2002.**
www.emea.eu.int/pdfs/human/bwp/335499en.pdf.
10. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. **Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources.** *ILAR J.* 2005;46(3):258-268.
11. Logtenberg T. **Antibody cocktails: next-generation biopharmaceuticals with improved potency.** *Trends Biotechnol.* 2007;25(9):390-394.

-
12. Diamant E, Torgeman A, Ozeri E, Zichel R. **Monoclonal Antibody Combinations that Present Synergistic Neutralizing Activity: A Platform for Next-Generation Anti-Toxin Drugs.** *Toxins (Basel)*. 2015;7(12):1854-1881.
 13. Lang AB, Cryz SJ, Schürch U, Ganss MT, Bruderer U. **Immunotherapy with human monoclonal antibodies. Fragment A specificity of polyclonal and monoclonal antibodies is crucial for full protection against tetanus toxin.** *J Immunol*. 1993;151(1):466-472.
 14. German-Fattal M, German A, Bizzini B. **Relation between protective potency and specificity of antibodies in sera of tetanus immunized individuals.** *Eur J Epidemiol*. 1987;3(2):119-122.
 15. Matsuda M, Kamei M, Sugimoto N, Ma Y, Hashizume S. **Characteristics of Toxin-Neutralization by Anti-Tetanus Human Monoclonal Antibodies Directed against the Three Functional Domains [A], [B] and [C] of the Tetanus Toxin Molecule and a Reliable Method for Evaluating the Protective Effects of Monoclonal Antibodies.** *Eur J Epidemiol*. 8:1-8.
 16. Scott N, Qazi O, Wright MJ, Fairweather NF, Deonarain MP. **Characterisation of a panel of anti-tetanus toxin single-chain Fvs reveals cooperative binding.** *Mol Immunol*. 2010;47(10):1931-1941.
 17. Volk WA, Bizzini B, Snyder RM, Bernhard E, Wagner RR. **Neutralization of tetanus toxin by distinct monoclonal antibodies binding to multiple epitopes on the toxin molecule.** *Infect Immun*. 1984;45(3):604-609.
 18. Both L, Banyard AC, van Dolleweerd C, Wright E, Ma JK-C, Fooks AR. **Monoclonal antibodies for prophylactic and therapeutic use against viral infections.** *Vaccine*. 2013;31(12):1553-1559. doi:10.1016/j.vaccine.2013.01.025
 19. Abboud N, Chow S-K, Saylor C, et al. **A requirement for FcγR in antibody-mediated bacterial toxin neutralization.** *J Exp Med*. 2010;207(11):2395-2405.
 20. Daëron M. **Fc Receptor biology.** *Annu Rev Immunol*. 1997;15(1):203-234.
 21. Datta-Mannan A, Witcher DR, Tang Y, Watkins J, Wroblewski VJ. **Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor.** *J Biol Chem*. 2007;282(3):1709-1717.
 22. Ziegler-Heitbrock HW, Reiter C, Trenkmann J, Fütterer A, Riethmüller G. **Protection of mice against tetanus toxin by combination of two human monoclonal antibodies recognizing distinct epitopes on the toxin molecule.** *Hybridoma*. 1986;5(1):21-31.
 23. Marks JD. **Deciphering antibody properties that lead to potent botulinum neurotoxin neutralization.** *Mov Disord*. 2004;19(S8):S101-S108.
 24. Nowakowski A, Wang C, Powers DB, et al. **Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody.** *Proc Natl Acad Sci U S A*.
-

-
- 2002;99(17):11346-11350.
25. Fan Y, Garcia-Rodriguez C, Lou J, et al. **A three monoclonal antibody combination potently neutralizes multiple botulinum neurotoxin serotype F subtypes.** *PLoS One*. 2017;12(3):e0174187.
 26. Cheng LW, Stanker LH, Henderson TD, Lou J, Marks JD. **Antibody protection against botulinum neurotoxin intoxication in mice.** *Infect Immun*. 2009;77(10):4305-4313.
 27. Froude JW, Stiles B, Pelat T, Thullier P. **Antibodies for biodefense.** *MAbs*. 2011;3(6):517-527.
 28. Kandasamy R, Voysey M, McQuaid F, et al. **Non-specific immunological effects of selected routine childhood immunisations: Systematic review.** *BMJ*. 2016;355:i5225.
 29. Goodridge HS, Ahmed SS, Curtis N, et al. **Harnessing the beneficial heterologous effects of vaccination.** *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):392-400.
 30. Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P. **A Small Jab - A Big Effect: Nonspecific Immunomodulation By Vaccines.** *Trends Immunol*. 2013;34(9):431-9.
 31. Reherrmann B, Shin E-C. **Private aspects of heterologous immunity.** *J Exp Med*. 2005;201(5):667.
 32. Gil A, Kenney LL, Mishra R, Watkin LB, Aslan N, Selin LK. **Vaccination and heterologous immunity: Educating the immune system.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015; 109(1):62-69.
 33. Saadatian-Elahi M, Aaby P, Shann F, et al. **Heterologous vaccine effects.** *Vaccine*. 2016;34(34):3923-3930.
 34. Levy O, Levy O. **Ready to benefit from training: Heterologous effects of early life immunization.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;109(1).
 35. Inić-Kanada AB, Stojanović MM, Živković IP, Petrušić VŽ, Dimitrijević LA. **The monoclonal antibody 26 raised against tetanus toxoid also recognizes tetanus toxin and β 2 -glycoprotein I – its binding properties in vitro and potential applications.** *J Serb Chem Soc*. 2009;74(3):245-257.
 36. Johnsen S, Andersen PL, Stanek G, et al. **Chlamydia Antibody Response in Healthy Volunteers Immunized with Nonchlamydial Antigens: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study.** *Clin Infect Dis*. 2003;36:586-591.
 37. Agergaard J, Lemvik G, Nante E, et al. **Serological evidence for Chlamydia pneumoniae infection following diphtheria-tetanus-pertussis booster vaccination.** *J Infect Dis Immun*. 2010;2(1):1-14.
-

-
38. Kyu HH, Mumford JE, Stanaway JD, et al. **Mortality from tetanus between 1990 and 2015: findings from the global burden of disease study 2015.** *BMC Public Health.* 2017;17:179.
 39. Thwaites CL, Loan HT. **Eradication of tetanus.** *Br Med Bull.* 2015;116(1):69.
 40. Karanikolas M, Velissaris D, Marangos M, Karamouzos V, Fligou F, Filos KS. **Prolonged high-dose intravenous magnesium therapy for severe tetanus in the intensive care unit: a case series.** *J Med Case Rep.* 2010;4(1):100.
 41. Louch HA, Buczko ES, Woody MA, Venable RM, Vann WF. **Identification of a binding site for ganglioside on the receptor binding domain of tetanus toxin.** *Biochemistry.* 2002;41(46):13644–13652.
 42. Bizzini B, Blass J, Turpin A, Raynaud M. **Chemical Characterization of Tetanus Toxin and Toxoid: Amino Acid Composition, Number of SH and S-S Groups and N-Terminal Amino Acid.** *Eur J Biochem.* 1970;17:100-105.
 43. Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, Verastegui C, Schiavo G. **The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons.** *Trends Microbiol.* 2003;11(9):431–437.
 44. Binz T, Rummel A. **Cell entry strategy of clostridial neurotoxins.** *J Neurochem.* 2009;109:1584-1595.
 45. Eisel U, Jarausch W, Goretzki K, et al. **Tetanus toxin: primary structure, expression in E. coli, and homology with botulinum toxins.** *EMBO J.* 1986;5(10):2495-2502.
 46. Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. **Fragment C of Tetanus Toxin: New Insights into Its Neuronal Signaling Pathway.** *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):6883-6901.
 47. De Filippis V, Vangelista L, Schiavo G, Tonello F, Montecucco C. **Structural studies on the zinc-endopeptidase light chain of tetanus neurotoxin.** *Eur J Biochem.* 1995;229(1):61-69.
 48. Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, Verastegui C, Schiavo G. **The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons.** *Trends Microbiol.* 2003;11(9):431-437.
 49. Chen C, Fu Z, Kim J-JP, Barbieri JT, Baldwin MR. **Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin.** *J Biol Chem.* 2009;284(39):26569-26577.
 50. Swaminathan S. **Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins.** *FEBS J.* 2011;278(23):4467-4485.
 51. Schwab ME, Suda K, Thoenen H. **Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport.** *J*
-

-
- Cell Biol.* 1979;82(3):798-810.
52. Boquet P, Dufloot E. **Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(24):7614-7618.
 53. Pirazzini M, Bordin F, Rossetto O, Shone CC, Binz T, Montecucco C. **The thioredoxin reductase-thioredoxin system is involved in the entry of tetanus and botulinum neurotoxins in the cytosol of nerve terminals.** *FEBS Lett.* 2013;587(2):150-155.
 54. Cornille F, Martin L, Lenoir C, Cussac D, Roques BP, Fournie-Zaluski MC. **Cooperative exosite-dependent cleavage of synaptobrevin by tetanus toxin light chain.** *J Biol Chem.* 1997;272(6):3459-3464.
 55. Abbas AK. **Antibodies and antigens.** In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 8th Edition, Saunders. 2014;87-106
 56. World Health Organization. **Tetanus vaccines: WHO position paper, February 2017 - Recommendations.** In: *WHO: Vaccine.* 2017;36(25):3573-3575. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.02.034.
 57. Thaysen-Andersen M, Jørgensen SB, Wilhelmsen ES, Petersen JW, Højrup P. **Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin.** *Vaccine.* 2007;25(12):2213-2227.
 58. Murphy SG. Tetanus toxin and antigenic derivatives. II. **Effect of protein and formaldehyde concentration on toxoid formation.** *J Bacteriol.* 1967;94(3):586-589.
 59. World Health Organization. **Expanded Programme on Immunization. WHO: Manual for the production and control of vaccines - tetanus toxoid.** :136 doi:BLG/UNDP/77.2 Rev.1
 60. Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. **The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism.** *Infect Immun.* 2001;69(2):1151-1159.
 61. Stojićević I, Dimitrijević L, Dovezenski N, et al. **Tetanus toxoid purification: Chromatographic procedures as an alternative to ammonium-sulphate precipitation.** *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(23).
 62. Latham WC, Michelsen CB, Edsall G. **Preparative procedure for the purification of toxoids by gel filtration.** *Appl Microbiol.* 1967;15(3):616-621.
 63. Latham WC, Jenness CP, Timperi RJ, et al. **Purification and characterization of tetanus toxoid and toxin. I. Fractionation of tetanus toxoid by gel filtration.** *J Immunol.* 1965;95(3):487-493.
 64. Ward WH, Britton P, van Heyningen S. **The hydrophobicities of cholera toxin,**
-

-
- tetanus toxin and their components.** *Biochem J.* 1981;199(2):457-460.
65. Rossetto O, Schiavo G, Polverino de Laureto P, Fabbiani S, Montecucco C. **Surface topography of histidine residues of tetanus toxin probed by immobilized-metal-ion affinity chromatography.** *Biochem J.* 1992; 285(1):9-12.
66. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, et al. Chapter 27 **Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review.** *Methods Enzymol.* 2009;463:439-473.
67. Birch JR, Racher AJ. **Antibody production.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(5-6):671-685.
68. Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. **Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations.** *Trends Biotechnol.* 2006;24(3):105-108.
69. Qazi O, Sesardic D, Tierney R, et al. **Reduction of the ganglioside binding activity of the tetanus toxin HC fragment destroys immunogenicity: implications for development of novel tetanus vaccines.** *Infect Immun.* 2006;74(8):4884-4891.
70. Qazi O, Sesardic D, Tierney R, et al. **Reduction of the ganglioside binding activity of the tetanus toxin HC fragment destroys immunogenicity: implications for development of novel tetanus vaccines.** *Infect Immun.* 2006;74(8):4884-4891.
71. WHO/UNICEF. **WHO: Status of elimination of trachoma as public health problem , 2017.**
http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Trachoma_2017.png.
72. Hu VH, Holland MJ, Burton MJ. **Trachoma: Protective and Pathogenic Ocular Immune Responses to Chlamydia trachomatis.** Lietman TM, ed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):e2020.
73. Rank RG. **Models of Immunity.** In: *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis and Immunity.* R. S. Stephens, ed.. Washington, DC: American Society for Microbiology.; 1999.
74. Rank RG, White HJ, Barron AL. **Humoral immunity in the resolution of genital infection in female guinea pigs infected with the agent of guinea pig inclusion conjunctivitis.** *Infect Immun.* 1979;26(2):573-579.
75. Rank RG, Barron AL. **Humoral immune response in acquired immunity to chlamydial genital infection of female guinea pigs.** *Infect Immun.* 1983;39(1):463-465.
76. Treharne JD, Shallal A. **The antigenic specificity of the humoral immune response to primary and repeated ocular infections of the guinea pig with the GPIC agent (Chlamydia psittaci).** *Eye.* 1991;5(3):299-304.
-

-
77. Ramsey KH, Soderberg LS, Rank RG. **Resolution of chlamydial genital infection in B-cell-deficient mice and immunity to reinfection.** *Infect Immun.* 1988;56(5):1320-1325.
 78. Rank RG. **Chapter 44—Chlamydia.** In: *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases.* Stanberry EbDTBR, ed.. London: Academic Press; 2009; 845–67.
 79. Kari L, Whitmire WM, Crane DD, et al. **Chlamydia trachomatis Native Major Outer Membrane Protein Induces Partial Protection in Nonhuman Primates: Implication for a Trachoma Transmission-Blocking Vaccine.** *J Immunol.* 2009; 182 (12) 8063-8070.
 80. Olsen AW, Follmann F, Erneholt K, Rosenkrands I, Andersen P. **Protection Against Chlamydia trachomatis Infection and Upper Genital Tract Pathological Changes by Vaccine-Promoted Neutralizing Antibodies Directed to the VD4 of the Major Outer Membrane Protein.** In: *Journal of Infectious Diseases.* ; 2015. doi:10.1093/infdis/jiv137
 81. Rockey DD, Wang J, Lei L, Zhong G. **Chlamydia vaccine candidates and tools for chlamydial antigen discovery.** *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(10):1365-1377.
 82. Brunham RC, Rey-Ladino J. **Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine.** *Nat Rev Immunol.* 2005;5(2):149-161.
 83. Rank RG, Batteiger BE. **Protective role of serum antibody in immunity to chlamydial genital infection.** *Infect Immun.* 1989;57(1):299-301.
 84. Longbottom D. **Chlamydial vaccine development.** *J Med Microbiol.* 2003;52(7):537-540.
 85. de la Maza LM, Zhong G, Brunham RC. **Update on Chlamydia trachomatis Vaccinology.** Papasian CJ, ed. *Clin Vaccine Immunol.* 2017;24(4):e00543-16.
 86. Stagg AJ. **Vaccines against Chlamydia: approaches and progress.** *Mol Med Today.* 1998;4(4):166-173.
 87. Aggerbeck H, Wantzin J, Heron I. **Booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. Comparison of three different vaccine formulations-III.** *Vaccine.* 1996;14(13):1265-1272.
 88. Fitzsimmons SP, Clark KC, Wilkerson R, Shapiro MA. **Inhibition of tetanus toxin fragment C binding to ganglioside G(T1b) by monoclonal antibodies recognizing different epitopes.** *Vaccine.* 2000;19(1):114-121.
 89. Janshoff A, Steinem C, Sieber M, el Bayâ A, Schmidt MA, Galla HJ. **Quartz crystal microbalance investigation of the interaction of bacterial toxins with ganglioside containing solid supported membranes.** *Eur Biophys J.* 1997;26(3):261-270.
-

-
90. Winter A, Ulrich WP, Wetterich F, Weller U, Galla HJ. **Gangliosides in phospholipid bilayer membranes: interaction with tetanus toxin.** *Chem Phys Lipids*. 1996;81(1):21-34.
 91. Fotinou C, Emsley P, Black I, et al. **The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin.** *J Biol Chem*. 2001;276(34):32274-32281.
 92. Stevens FJ. **Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody.** *Mol Immunol*. 1987;24(10):1055-1060.
 93. Wilkinson KD. **Quantitative Analysis of Protein-Protein Interactions.** In: *Protein-Protein Interactions*. New Jersey: Humana Press; 2004:015-032.
 94. Šeatović S, Inić-Kanada A, Stojanović M, Živković I, Jankov RM, Dimitrijević L. **Development of Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Tetanus Toxoid Concentration.** *J Immunoass Immunochem*. 2004;25(1):31-44.
 95. Ackerman ME, Crispin M, Yu X, et al. **Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity.** *J Clin Invest*. 2013;123(5):2183-2192.
 96. Jefferis R. **Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics.** *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(3):226-234.
 97. Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. **An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life.** *J Immunol*. 2006;176(1):346-356.
 98. Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84(5):548-558.
 99. Wang W, Lu P, Fang Y, et al. **Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences.** *Drug Metab Dispos*. 2011;39(9):1469-1477.
 100. Lafaye P, Nato F, Mazié JC, Doyen N. **Similar binding properties for a neutralizing anti-tetanus toxoid human monoclonal antibody and its bacterially expressed Fab.** *Res Immunol*. 146(6):373-382.
 101. Notkins AL. **Polyreactivity of antibody molecules.** *Trends Immunol*. 2004; 25:174-179.
 102. Zwick MB, Wang M, Poignard P, et al. **Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies.** *J Virol*. 2001;75(24):12198-12208.
-

-
103. Diamant E, Torgeman A, Ozeri E, Zichel R. **Monoclonal antibody combinations that present synergistic neutralizing activity: A platform for next-Generation anti-toxin drugs.** *Toxins (Basel)*. 2015;7:1854-1881.
 104. Lukić I, Marinković E, Filipović A, et al. **Key protection factors against tetanus: Anti-tetanus toxin antibody affinity and its ability to prevent tetanus toxin - Ganglioside interaction.** *Toxicon*. 2015;103:135-144.
 105. Djavadi-Ohanian L, Friguet B, Goldberg ME. **Structural and functional influence of enzyme-antibody interactions: effects of eight different monoclonal antibodies on the enzymatic activity of Escherichia coli tryptophan synthase.** *Biochemistry*. 1984;23(1):97-104.
 106. Friguet B, Djavadi-Ohanian L, Pages J, Bussard A, Goldberg M. **A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the beta 2-subunit of Escherichia coli tryptophan synthase.** *J Immunol Methods*. 1983;60(3):351-358.
 107. Shields SJ, Oyeyemi O, Lightstone FC, Balhorn R. **Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure.** *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003;14(5):460-470.
 108. Bordbar AK, Saboury AA, Moosavi-Movahedi AA. **The shapes of Scatchard plots for systems with two sets of binding sites.** *Biochem Educ*. 1996;24(3):172-175.
 109. Yousefi M, Khosravi-Eghbal R, Reza Mahmoudi A, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H, Shokri F. **Comparative in vitro and in vivo assessment of toxin neutralization by anti-tetanus toxin monoclonal antibodies.** *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(2):344-351.
 110. Hu VH, Harding-Esch EM, Burton MJ, Bailey RL, Kadimpeul J, Mabey DCW. **Epidemiology and control of trachoma: Systematic review.** *Trop Med Int Heal*. 2010;15(6):673-91.
 111. Mullan L. **Pairwise sequence alignment—it's all about us!** *Brief Bioinform*. 2006;7(1):113-115.
 112. Madden T. **The BLAST Sequence Analysis Tool.** In: The NCBI Handbook. 2nd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013.
 113. Brunham RC, Peeling RW. **Chlamydia trachomatis antigens: role in immunity and pathogenesis.** *Infect Agents Dis*. 1994;3(5):218-233.
 114. Vasilevsky S, Stojanov M, Greub G, Baud D. **Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates.** *Virulence*. 2016;7(1):11-22.
-

-
115. Sanchez-Campillo M, Bini L, Comanducci M, et al. **Identification of immunoreactive proteins of *Chlamydia trachomatis* by Western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera.** *Electrophoresis*. 1999;20(11):2269-2279.
 116. Gomes JP, Hsia RC, Mead S, Borrego MJ, Dean D. **Immunoreactivity and differential developmental expression of known and putative *Chlamydia trachomatis* membrane proteins for biologically variant serovars representing distinct disease groups.** *Microbes Infect*. 2005; 7(3):410-420.
 117. Crane DD, Carlson JH, Fischer ER, et al. ***Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1894-1899.
 118. Frikha-Gargouri O, Gdoura R, Znazen A, et al. **Evaluation of an in silico predicted specific and immunogenic antigen from the OmcB protein for the serodiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections.** *BMC Microbiol*. 2008;8(1):217.
 119. Fadel S, Eley A. ***Chlamydia trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin.** *J Med Microbiol*. 2007;56(1):15-22.
 120. Qi M, Gong S, Lei L, Liu Q, Zhong G. **A *Chlamydia trachomatis* OmcB C-terminal fragment is released into the host cell cytoplasm and is immunogenic in humans.** *Infect Immun*. 2011;79(6):2193-2203.
 121. Batteiger BE. **The major outer membrane protein of a single *Chlamydia trachomatis* serovar can possess more than one serovar-specific epitope.** *Infect Immun*. 1996;64(2):542-547.
 122. Hayes LJ, Clarke IN. **Nucleotide sequence of the major outer membrane protein gene of *Chlamydia trachomatis* strain A/SA1/OT.** *Nucleic Acids Res*. 1990;18(20):6136.
 123. Gomes JP, Hsia R, Mead S, Borrego MJ, Dean D. **Immunoreactivity and differential developmental expression of known and putative *Chlamydia trachomatis* membrane proteins for biologically variant serovars representing distinct disease groups.** *Microbes Infect*. 2005;7(3):410-420.
 124. Frikha-Gargouri O, Gdoura R, Znazen A, et al. **Evaluation of an in silico predicted specific and immunogenic antigen from the OmcB protein for the serodiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections.** *BMC Microbiol*. 2008;8(1):217.
 125. Rank RG, Batteiger BE, Soderberg LSF. **Susceptibility to Reinfection after a Primary Chlamydial Genital Infection.** *Infect Immun*. 1988:2243-2249.
 126. Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, Caldwell HD. **Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars.** *Infect Immun*.
-

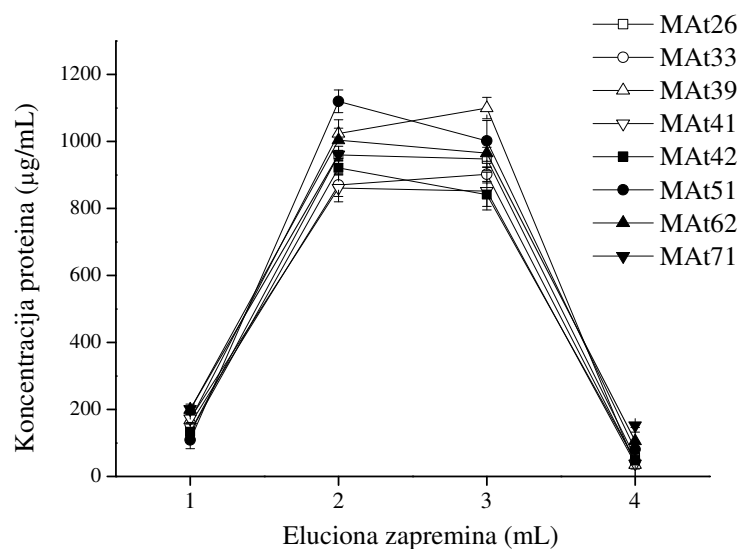
-
- 1989;57(4):1040-1049.
127. Ortiz L, Demick KP, Petersen JW, et al. **Chlamydia trachomatis major outer membrane protein (MOMP) epitopes that activate HLA class II-restricted T cells from infected humans.** *J Immunol.* 1996;157(10):4554-4567.
 128. Zhang CYX, Stewart S, Joseph T, et al. **Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*.** *J Immunol* 1987;138(2):575-581.
 129. Kim SK, DeMars R. **Epitope clusters in the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*.** *Curr Opin Immunol.* 2001;13(4):429-436.
 130. Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. **Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes.** *J Bacteriol.* 1987;169(9):3879-3885.
 131. Zhong GM, Brunham RC. **Immunoaccessible peptide sequences of the major outer membrane protein from *Chlamydia trachomatis* serovar C.** *Infect Immun.* 1990;58(10):3438-3441.
 132. Andrew DW, Hafner LM, Beagley KW, Timms P. **Partial protection against chlamydial reproductive tract infection by a recombinant major outer membrane protein/CpG/cholera toxin intranasal vaccine in the guinea pig *Chlamydia caviae* model.** *J Reprod Immunol.* 2011;91(1-2):9-16.
 133. Everett KD, Bush RM. **Molecular evolution of the Chlamydiaceae.** *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(1):203-220.
 134. Kringelum JV, Nielsen M, Padkjær SB, Lund O. **Structural analysis of B-cell epitopes in antibody: Protein complexes.** *Mol Immunol.* 2013; 53(1-2):24-34.
 135. Peng H-P, Lee KH, Jian J-W, Yang A-S. **Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions.** *Proc Natl Acad Sci.* 2014; 111(26):E2656-E2665.
 136. Conte L Lo, Chothia C, Janin JÈL. **The Atomic Structure of Protein-Protein Recognition Sites.** *J Mol Biol.* 1999;285(5):2177-98.
 137. Bogan A, Thorn K. **Anatomy of Hot Spots in Protein Interfaces.** *J Mol Biol .* 1998;280:1-7.
 138. Clackson T, Wells JA. **A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface.** *Science.* 1995;267(5196):383-386.
 139. Inic-Kanada A, Stojanovic M, Schlacher S, et al. **Delivery of a chlamydial adhesin N-PmpC subunit vaccine to the ocular mucosa using particulate carriers.** *PLoS One.* 2015;10(12): e0144380
 140. Feher VA, Randall A, Baldi P, Bush RM, de la Maza LM, Amaro RE. **A 3-**
-

-
- Dimensional Trimeric β -Barrel Model for Chlamydia MOMP Contains Conserved and Novel Elements of Gram-Negative Bacterial Porins.** *PLoS One*. 2013;8(7):e68934.
141. Brunham RC, Rey-Ladino J. **Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine.** *Nat Rev Immunol*. 2005;5(2):149-161.
142. Preneta-Blanc R, Rigsby P, Wilhelmsen ES, Tierney R, Brierley M, Sesardic D. **Calibration of replacement international standards of diphtheria and tetanus toxoids for use in flocculation test.** *Biologicals*. 2008;36(5):315-326.
143. Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
144. Perkins SJ, Nealis AS, Sutton BJ, Feinstein A. **Solution structure of human and mouse immunoglobulin M by synchrotron X-ray scattering and molecular graphics modelling: A possible mechanism for complement activation.** *J Mol Biol*. 1991;221(4):1345-1366.
145. Friguet B, Chaffotte AF, Djavadi-Ohanian L, Goldberg ME. **Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay.** *J Immunol Methods*. 1985;77(2):305-319.
146. Mould DR, Sweeney KRD. **The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies--mechanistic modeling applied to drug development.** *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2007;10(1):84-96.
147. Rank RG, Dascher C, Bowlin AK, Bavoil PM. **Systemic immunization with Hsp60 alters the development of chlamydial ocular disease.** *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(7):1344-51.
148. Wilson DP, Bowlin AK, Bavoil PM, Rank RG. **Ocular Pathologic Response Elicited by Chlamydia Organisms and the Predictive Value of Quantitative Modeling.** *J Infect Dis*. 2009;199(12):1780-1789.
-

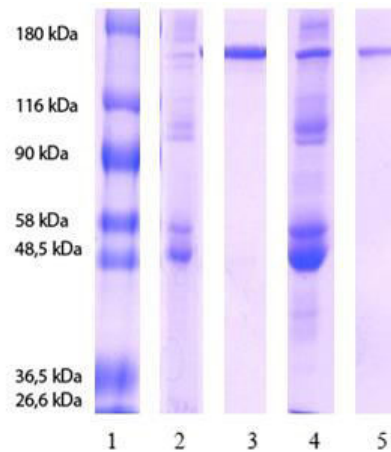
8. PRILOZI

8.1 Karakteristike antitela i antigena korišćenih u radu

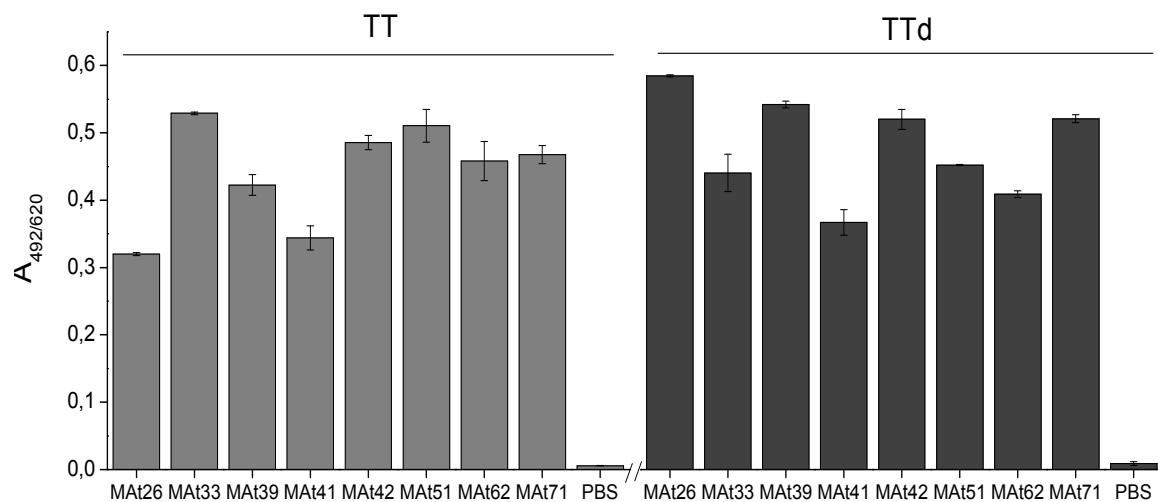
8.1.1 Anti-TTd/TT monoklonska antitela



Slika 8.1. Elucioni profil pri prečišćavanju MAAt afinitetnom hromatografijom na *HiTrap Protein G* koloni. Pufer za vezivanje uzorka 0,02 M NaPO₃, pH 7; elucioni pufer 0,1 M glicin-HCl, pH =2,7. Frakcije zapremine 1 mL eluirane su u epruvete u kojima se nalazio 1M Tris, pH=9. Nakon dijalize naspram PBS-a koncentracija proteina u sakupljenim uzorcima (1mL) je određena merenjem apsorbance na 280nm i primenom Lambert- Beer-ov zakona. Za izračunavanje koncentracije korišćen je apsorpcioni koeficijent (1 mg/mL) za mišji IgG 1,43¹⁴⁴. Uzorci su analizirani u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije proteina ± standardna greška.



Slika 8.2. Elektroforetska analiza pre i nakon prečišćavanja MAT33 i MAT39 afinitetnom hromatografijom na *HiTrap Protein G* koloni. Neredukciona SDS-PAGE (9 % PAAG, Mini Protean II System, Bio-Rad) uzoraka: 1) molekularni marker (*high molecular weight molecular markers*, Pharmacia) pripremljenih po preporuci proizvođača; 2) nevezani proteini iz supernatanta hibridoma koji sekretuje MAT33; 3) MAb 33 specifično eluiran; 4) nevezani proteini iz supernatanta hibridoma koji sekretuje MAT39; 5) MAT33 specifično eluiran.



Slika 8.3. Reaktivnost MAt ka TT i TTd preparatima. Sposobnost izolovanih MAt (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) da interaguju sa TT / TTd molekulima (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) adsorbovanim na Maxi Sorp ploču potvrđena je ELISA testom. Svi uzorci su analizirani u triplikatu i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $A_{492/620} \pm$ standardna greška

8.1.2 Karakteristike TTd i TT preparata dobijenih prečišćavanjem HIC-om

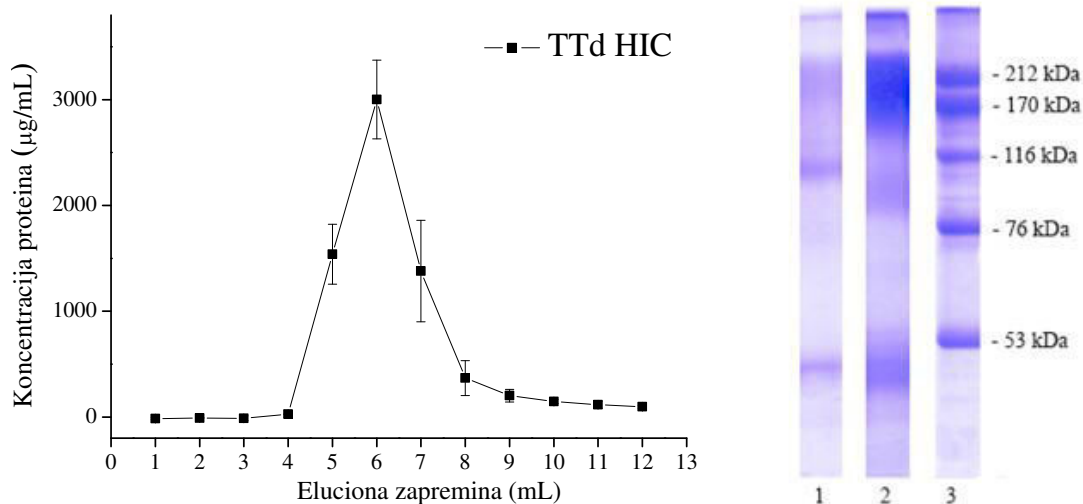
Tabela 8.1. Karakteristike nativnog TT preparata i nativnog TTd preparata

	Nativni TT	Nativni TTd
Ukupan azot (mg/mL) ^a	3,725 ± 0,075	3,555 ± 0,195
Proteinski azot (mg/mL) ^a	0,066 ± 0,004	0,065 ± 0,005
Koncentracija proteina ^b (mg/mL)	0,282 ± 0,018	0,402 ± 0,018
Antigenost (Lf / mL)	72,5 ± 2,5	67,5 ± 2,5
Vreme flokulacije (Kf) (min)	12,5 ± 1,5	16,0 ± 2,0
Čistoća (Lf / mg PN)	1148 ± 61	1033 ± 33

Uzorci su analizirani u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška.

^a Određeno Kjeldahl-ovom metodom

^b Određeno Bradford-ovom metodom.



Slika 8.4. A) Elucioni profil pri prečišćavanju TTd-a hidrofobnom hromatografijom na *HiTrap*TM *Phenyl Sepharose* koloni. Pufer za vezivanje uzorka 0,5 M (NH₄)₂SO₄/ 3 M NaCl/ 20 mM Na-fosfatnim puferom, pH 7,6; elucioni pufer 20 mM Na-fosfatnim puferom, pH 7,6. Koncentracija proteina u sakupljenim uzorcima (1mL) određena metodom po Bradford-u. Uzorci su analizirani u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije proteina ± standardna greška. B) Elektroforetska analiza TTd preparata pre i nakon prečišćavanja HIC-om. Redukciona SDS-PAGE (9 % PAAG, Mini Protean II System, Bio-Rad): 1) nativni TTd; 2) TTd prečišćen hidrofobnom hromatografijom; 3) molekulska markeri (high molecular weight molecular markers, Pharmacia) pripremljenih po preporuci proizvođača.

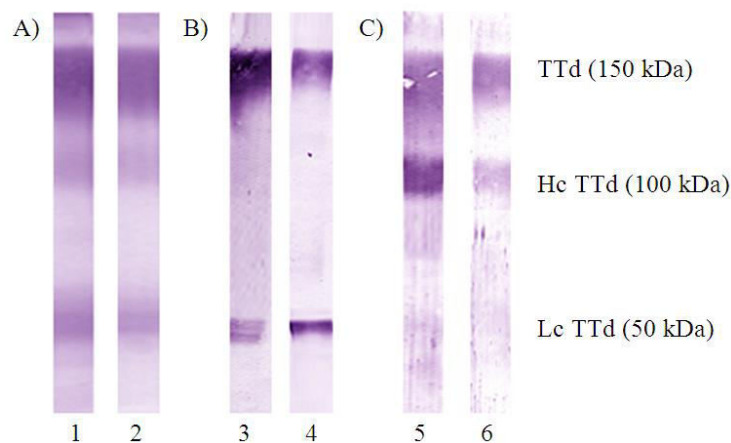
Tabela 8.2. Čistoća i prinos dobijenih TTd preparata

	HIC	AS
Proteini (mg/mL) ^a	1,24 ± 0,42	1,32 ± 0,38
Prinos (%) ^b	67,7 ± 13,8	65,4 ± 7,9
Čistoća TTd (Lf / mg PN)	2097 ± 97	1912 ± 14

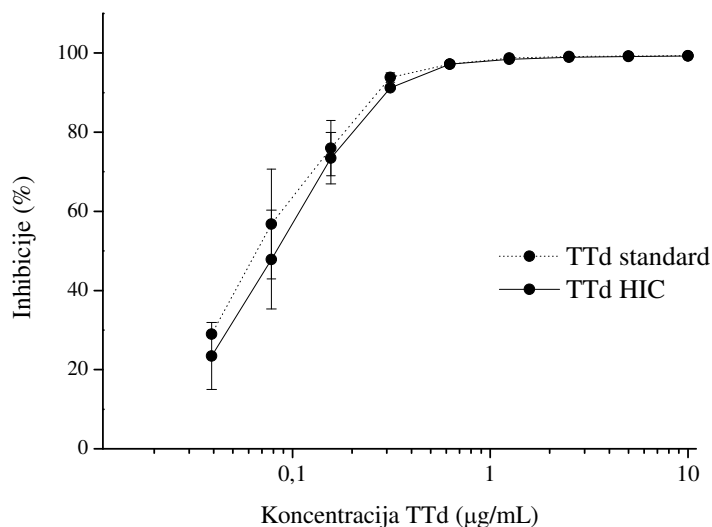
Uzorci su analizirani u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška.

^aPN koncentracija je izračunata deljenjem proteinske koncentracije određene Bradford-om metodom faktorom 6,25

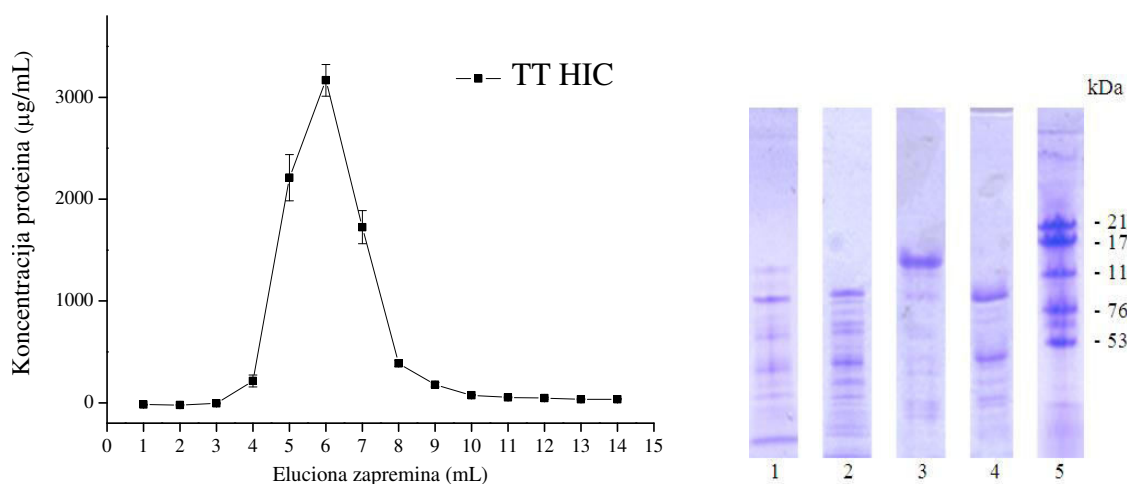
^bIzračunato kao prinos Lf u odnosu na nativni TTd preparat.



Slika 8.5. Western blot analiza reaktivnosti MAT26, MAT51 i MAT71 sa TTd-om. Nakon redukcione SDS-PAGE (9% PAAG, Mini Protean II System, Bio-Rad) uzorci: 1) TTd standard (Tetanus Toxoid (Non-Adsorbed) NIBSC, code: 02/232); 2) TTd izolovan hidrofobnom hromatografijom su transferovani na polivinil difluoridnu membranu. Očuvana antigenost TTd-a analizirana je u prisustvu: A) MAT26; B) MAT51 i C) MAT71. Za vizuelizaciju interakcije MAT (korišćeni u biotinisanoj formi) i TTd-a korišćen je sisitem extrAvidin-alkalna fosfataza//NBT/BCIP.



Slika 8.6. Imunogene karakteristike TTd preparata dobijenih nakon HIC-a i AS precipitacije u odnosu na standard TTd-a. Inhibicija vezivanja standardnog humanog anti-tetanusnog imunoglobulina (NIBSC code: TE-3) za TT (2 µg/mL) adsorbovanog na ELISA mikrotitar ploče pomoću TTd preparata nakon prečišćavanja hidrofobnom hromatografijom i standardnog TTd (Tetanus Toxoid (Non-Adsorbed) NIBSC, code: 02/232). Korišćene smeše standardnih anti-tetanusnih imunoglobulina (0,1 IU/mL) i specifičnih TTd preparata u rastućim koncentracijama preinkubirane su 1h na sobnoj temperaturi. Procenat inhibicije izračunat je u odnosu na vezivanje standardnog humanog anti-tetanusnog imunoglobulina (NIBSC code: TE-3) za TT bez prisustva TTd (100 % vezivanje). Uzorci su analizirani u triplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost procenta inhibicije ± standardna greška.



Slika 8.7. A) Elucioni profil pri prečišćavanju TT-a hidrofobnom hromatografijom na HiTrap™ Phenyl Sepharose koloni. Puffer za vezivanje uzorka 0,5 M (NH₄)₂SO₄/ 3 M NaCl/ 20 mM Na-fosfatnim pufferom, pH 7,6; elucioni puffer 20 mM Na-fosfatnim pufferom, pH 7,6. Koncentracija proteina u sakupljenim uzorcima (1mL) određena metodom po Bradford-u. Uzorci su analizirani u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije proteina ± standardna greška. B) Elektroforetska analiza TT preparata pre i nakon prečišćavanja hidrofobnom hromatografijom na HiTrap™ Phenyl Sepharose koloni. SDS-PAGE (4-15 % PAAG, PhastSystem, Pharmacia): 1) nativni TT preparat u neredukujućim uslovima; 2) nativni TT preparat u redukujućim uslovima; 3) TT preparata dobijen hidrofobnom hromatografijom na HiTrap™ Phenyl Sepharose koloni u neredukujućim; 4) TT preparata dobijen hidrofobnom hromatografijom na HiTrap™ Phenyl Sepharose koloni u redukujućim

uslovima; 5) molekularski markeri (*high molecular weight molecular markers, Pharmacia*) su pripremljeni prema preporuci proizvođača.

Tabela 8.3. Karakteristike TT preparata

Ukupan azot (TN)^a	0,458 ± 0,028 mg/mL
Proteinski azot (PN)^a	0,204 ± 0,012 mg/mL
Koncentracija proteina^b	1,404 ± 0,158 mg/mL
Antigenost	500 ± 50 Lf / mL
Vreme flokulacije (Kf)	12,5 ± 1,5 min
Čistoća TT	2451 ± 95 Lf / mg PN
LD₅₀/zamorcu	(8,0 ± 0,7) x 10 ⁵ LD ₅₀ /mL

Uzorci su analizirani u duplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška;

^a*Određeno Kjeldahl-ovom metodom;*

^b*Određeno Bradford-ovom metodom.*

OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

1. Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu (kategorija M21)

Lukić I, Filipović A, Inić-Kanada A, Marinković E, Miljković R, Stojanović M. Cooperative binding of anti-tetanus toxin monoclonal antibodies: implications for designing an efficient bivalent preparation to prevent tetanus toxin intoxication. *Vaccine* 2018; 36(26): 3764-3771

Категорија M21: 2015 – Medicina, istraživanje i eksperimenti 36/124, ИФ 3,413

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X18306789>

2. Rad objavljen u međunarodnom časopisu (kategorija M22)

Lukić I, Marinković E, Filipović A, Krnjaja O, Kosanović D, Inić-Kanada A, Stojanović M. Key protection factors against tetanus: Anti-tetanus toxin antibody affinity and its ability to prevent tetanus toxin - ganglioside interaction. *Toxicon* 2015; 103: 135-144

Категорија M22: 2013 – toksikologija 35/87, ИФ 2,581

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115001725?via%3Dihub>



Cooperative binding of anti-tetanus toxin monoclonal antibodies: Implications for designing an efficient bivalent preparation to prevent tetanus toxin intoxication



Ivana Lukic^a, Ana Filipovic^a, Aleksandra Inic-Kanada^b, Emilija Marinkovic^a, Radmila Miljkovic^a, Marijana Stojanovic^{a,*}

^a Department of Research and Development, Institute of Virology, Vaccines and Sera – TORLAK, Vojvode Stepe 458, 11152 Belgrade, Serbia

^b OCUVAC – LBCE, Institute of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Kinderspitalgasse 15, 1090 Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2018

Received in revised form 7 May 2018

Accepted 11 May 2018

Keywords:

Antibodies

Cooperative effect

Protection

Tetanus toxin

ABSTRACT

Oligoclonal combinations of several monoclonal antibodies (MAbs) are being considered for the treatment of various infectious pathologies. These combinations are less sensitive to antigen structural changes than individual MAbs; at the same time, their characteristics can be more efficiently controlled than those of polyclonal antibodies. The main goal of this study was to evaluate the binding characteristics of six bivalent equimolar preparations (BEP) of tetanus toxin (TeNT)-specific MAbs and to investigate how the MAb combination influences the BEPs' protective capacity. We show that a combination of TeNT-specific MAbs, which not only bind TeNT but also exert positive cooperative effects, results in a BEP with superior binding characteristics and protective capacity, when compared with the individual component MAbs. Furthermore, we show that a MAb with only partial protective capacity but positive effects on the binding of the other BEP component can be used as a valuable constituent of the BEP.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tetanus is a severe and often fatal disease that can develop after exposure to the tetanus toxin (TeNT),¹ a neurotoxin produced by the anaerobic bacterium *Clostridium tetani*. Mandatory vaccination against tetanus was introduced worldwide and was a crucial measure that led to a significant decline of cases during the second half of the 20th century [1]. Nevertheless, the prevalence of the disease is not negligible, particularly in the developing world [2]. Tetanus cases are mostly reported in elderly patients, as immunity to tetanus disappears gradually over time [3]. In addition, tetanus outbreaks related to injuries seen during natural disasters such as earthquakes and tsunamis have been documented by the WHO [4].

TeNT intoxications can be efficiently treated with various polyclonal antibody (PoAb)²-based therapies [4,5]. The WHO recommends treatment with human immunoglobulin preparations [6]. However, polyclonal preparations of animal origin, consisting of TeNT-binding (F(ab)₂) fragments, are still used when human-

derived preparations are not available. The manufacture and use of animal-derived therapeutic products has several problems: (i) a long immunization procedure, (ii) batch-to-batch variation in the therapeutic efficacy [7], (iii) potential patient hypersensitivity, and (iv) the risk of acquiring certain zoonosis [8]. In contrast, human-derived products significantly reduce the risk of reactogenicity. They also carry certain difficulties, such as a requirement for intensive pathogen-focused control and a tedious large-scale production process.

Currently, monoclonal antibodies (MAbs)³ are considered the reagent of choice for tetanus prevention/treatment [9]. It has already been shown that a high affinity toward TeNT does not automatically result in a protective effect against TeNT intoxication, since high affinity is only one of the requirements [10–12]. To be considered protective, an antibody must not only recognize TeNT with sufficiently high affinity but also prevent the initial step in TeNT intoxication (i.e., the interaction of TeNT with gangliosides exposed on the surface of neurons) [13]. This is in line with recommendations for MAbs, which are expected to provide protection against botulinum toxin, a molecule that closely resembles TeNT, both structurally

* Corresponding author.

E-mail address: mstojanovic@torlak.rs (M. Stojanovic).

¹ TeNT – tetanus toxin.

² PoAbs – polyclonal antibodies.

³ MAb – monoclonal antibody.



Key protection factors against tetanus: Anti-tetanus toxin antibody affinity and its ability to prevent tetanus toxin – ganglioside interaction



Ivana Lukić, Emilija Marinković, Ana Filipović, Ognjen Krnjaja, Dejana Kosanović, Aleksandra Inić-Kanada¹, Marijana Stojanović*

Institute of Immunology, Virology, Vaccine and Sera – Torlak, Vojvode Stepe 458, 11152, Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 January 2015

Received in revised form

6 May 2015

Accepted 18 June 2015

Available online 2 July 2015

Keywords:

Tetanus toxin

Monoclonal antibody

Binding characteristics

Protection

ABSTRACT

Antibodies capable to neutralize tetanus toxin (TeNT) are key factors in protection against tetanus disease. Although antibody-based therapeutics for treatment of tetanus exist on the market its production is tedious. Hence, the tetanus-specific antibodies preparation that could be easily produced in large scale *in vitro* would be beneficial. Monoclonal antibodies (MAbs) are considered for a long time as a reagent of choice, but the core drawback is how to select a MAb that would be safe in providing efficacious protection. In this study we have investigated the parameters crucial for a single MAB to be assigned as protective. Eight murine MAbs were characterized *in vitro* for their reactivity toward TeNT and assessed *in vivo* for protectiveness against TeNT intoxication. Correlation of *in vitro* and *in vivo* data has revealed that *in vitro* selection of MAB that is protective *in vivo* could be performed by a combination of two assays: the measurement of MAB affinity toward TeNT taking $K_a 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ as a threshold level, and the evaluation of its capability to prevent TeNT-ganglioside interaction. Single MAB could be taken into consideration as a potential therapeutic only if it has a capacity to completely inhibits TeNT-ganglioside complex formation.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mandatory vaccination against tetanus is introduced worldwide and it was crucial for significant decline of tetanus cases during second half of XX century (Atkinson et al., Eds, 2012). Incidence of tetanus cases is low in developed countries. Tetanus cases are mostly recorded in elder as the immunity to tetanus is not life-long (Taylor, 2006), but there is still a high prevalence of the disease in the developing world. WHO documented outbreaks of tetanus related to injuries associated with natural disasters such as earthquakes and tsunamis (2010).

The tetanus disease appears upon intoxication by tetanus toxin (TeNT), neurotoxin produced by anaerobic bacteria *Clostridium tetani*. TeNT consists of two polypeptide chains, heavy (H; 100 kDa)

and light (L; 50 kDa) chain, and bind to neurons via ganglioside-binding sites located on C-terminal portion of H chain (Hc fragment; Louch et al., 2002).

As for non-vaccinated/partially protected subjects, when there is suspicion on TeNT intoxication, various polyclonal antibodies-based therapeutics are in use (WHO, 2010; Hassel, 2013). Although current WHO recommendation (2010) is to use human immunoglobulin preparations in non-immunized or incompletely immunized patients, equine antitoxin, e.g. polyclonal TeNT-binding fragments (F(ab)₂) prepared from sera of horses immunized with adjuvanted tetanus toxoid (TTd), is still in use when human derived antibodies preparations are not available. Two types of human tetanus-specific antibodies preparations exist on market (Atkinson et al., Eds, 2012): (i) human tetanus immunoglobulins (TIG) prepared from the plasma of healthy volunteers specifically immunized against tetanus, and (ii) polyvalent immunoglobulins for intravenous administration (IVIG). The production and use of animal derived therapeutics are connected with several obstacles that limit their use: 1) long immunization procedure, 2) batch-to-batch variation in the therapeutic efficacy, 3) potential hypersensitivity of recipient and 4) the risk of

* Corresponding author. Department of Research and Development, Institute of Virology, Vaccine and Sera – Torlak Vojvode, Stepe 458, 11152 Belgrade, Serbia.

E-mail address: mstojanovic@torlak.rs (M. Stojanović).

¹ Present address: OCUVAC – Center of Ocular Inflammation and Infection, Laura Bassi Centers of Expertise, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

acquiring certain zoonosis (Committee for proprietary medicinal products, 2002). The use of human derived products significantly reduces the risk of recipient's reactogenicity but is also facing difficulties – it requires intensive pathogen-focused control and their production in large quantities is tedious.

Taking all aforementioned into consideration, it is clear that there is a need for highly tetanus-specific antibodies preparation that could be easily produced in large scale *in vitro*. Monoclonal antibodies (MAbs) could be a reagent of choice, but the drawback is how to select MAb(s) that would be safe in providing efficacious protection. Nowadays available data clearly demonstrate that the ability of a single MAb to bind TeNT does not necessarily mean that this MAb protects from tetanus intoxication (Lang et al., 1993). It has been shown that MAbs specific for epitopes located in various parts of TeNT could be protective (Matsuda et al., 1992; Scott et al., 2010; Vilik et al., 1984) but the blocking of TeNT interaction with neurons seems to be a crucial moment for tetanus disease prevention (Quazi et al., 2006). However, the binding of MAb to ganglioside-binding area in Hc, which is the part of TeNT responsible for the very first contact with neurons, obviously does not ensure protection and vice versa (German-Fattal et al., 1987).

According to the literature, there is no described *in vitro* system or defined parameters that could be used for prediction of protectiveness of anti-TeNT antibodies. Animal experiments are still mandatory for clear confirmation of protective potential of anti-TeNT antibodies. Yet, *in vivo* assessment of protective potential of each particular TeNT-specific antibody is tedious and raises ethical concern as these experiments require large numbers of animals.

The aim of our study was to investigate, which parameters are crucial for a single MAb to be assigned as a protective. Eight murine anti-TeNT MAbs were characterized in details for their reactivity toward TeNT and assessed in murine model system for protectiveness against TeNT intoxication. Definition of parameters useful for prediction of protective capacity against tetanus was made upon correlation of *in vitro* and *in vivo* results. The selection of predictive *in vitro* parameters could have an impact on fast anti-tetanus antibodies production and would be beneficial for animal use reduction and refinement in tetanus experiments.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

Ten weeks old Swiss white mice were used in the experiments. All animal experiments conformed to the Serbian laws and European regulations on animal welfare and were approved by the committee section at the Institute of Virology, Vaccines and Sera – Torlak and by the Ethics Committee for the Welfare of Experimental Animals of Republic Serbia (Approval No. 011-00-00510/2011-05/5).

2.2. Anti-TeNT monoclonal antibodies

Eight murine TeNT-specific MAbs that are produced by hybridoma cells and belong to the same IgG subclass, IgG1 (Seatovic et al., 2004) were used in the experiments. MAbs are assigned as MAb26, MAb33, MAb39, MAb41, MAb42, MAb51, MAb62, and MAb71. By selection of MAbs belonging to the same IgG subclass we try to avoid dissimilar influences of Fc-mediated mechanisms and to ensure that the differences in protection against TeNT intoxication could be ascribed only to specificity of MAb's interaction with TeNT. As an additional criterion, the selected MAbs did not possess extremely high affinity toward TeNT as we wanted to be able to catch the threshold values of affinity required for protection.

Specific hybridomas were cultivated in disposable two-compartment bioreactors CELLine CL 350 (Integra Bioscience AG,

Zizers, Switzerland). MAbs were purified from corresponding supernatant by affinity chromatography on HiTrap Protein G column (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

2.3. Antigens

TeNT used in ELISAs and Western blot analysis was purified by hydrophobic chromatography from a supernatant of *C. tetani* culture. Supernatant is obtained by culture filtration through filter having 0.2 µm wide pores as a part of standard manufacturing process of TTd at Institute of Virology, Vaccines and Sera – Torlak, Belgrade, Serbia. The applied purification procedure was the same as the one originally used for purification of TTd (described by Stojicevic et al., 2011). Briefly, column packed with Phenyl/Sepharose (HiTrap Phenyl HP column, 5 ml, GE Healthcare) was equilibrated in 0.5 M (NH₄)₂SO₄/3 M NaCl/0.02 M Na-phosphate buffer, pH 7.6. Supernatant of *C. tetani*, which contained 0.5 M (NH₄)₂SO₄ and 3 M NaCl was loaded on the column. After removal of unbound/weakly bound proteins (column washing with 3 M NaCl/0.02 M Na-phosphate buffer, pH 7.6), TeNT is eluted by 0.02 M Na-phosphate buffer, pH 7.6. The purity of the obtained TeNT is checked by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Suppl. 1).

2.4. Western blot analysis

Reactivity of selected MAbs toward TeNT's L and H chain was tested by Western blot. TeNT was resolved by reducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on 9% separating gel, with 4% stacking gels (Mini Protean II System, Bio-Rad, USA). The proteins were transferred to 0.2 µm nitrocellulose membrane (NC2, Serva) for 1 h at 1–1.5 mA/cm² (Multiphor II System, LKB, Sweden) in buffer containing 25 mM Tris (Serva), 193 mM glycine (Sigma), and 15% methanol (Fluka). To prevent non-specific antibody binding, the membranes were incubated with blocking buffer, 3% BSA (Sigma) in PBS, for 2 h. Saturated membranes were incubated in solution of biotin-labeled MAbs (diluted in blocking buffer, 10 µg/ml) for 1 h at room temperature (RT). Then, membranes were incubated with extrAvidin-alkaline phosphatase (Sigma) diluted according to the manufacturer's instruction. The membranes were washed four times with 0.05% Tween 20 (Sigma)/PBS after the incubations. The antibody binding was visualized by exposure to 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT; Sigma).

2.5. Determination of TTd/TeNT MAbs half-life in serum

To evaluate half-life (t_{1/2}) of selected MAbs in circulation, MAb/PBS solutions were administered to the mice (5 mice for each MAb) via tail vein (i.v.) and MAbs presence in mouse sera was followed for 7 days. To avoid the influence of initial concentration to the t_{1/2} in serum (Mould and Sweeney, 2007), all MAbs were administered in the same concentration (50 µg MAb in 100 µl per mice). As the reactivity of IgG toward TeNT in sera collected prior to the treatment was negligible, the reactivity toward TeNT in sera samples collected upon the treatment is ascribed to the injected MAb. First blood sample was taken 8 h upon MAb administration and considered as the one having maximal MAb concentration (determined by previous experiments (Inic-Kanada et al., 2009a)). Further collection of blood samples was performed for next 7 days in 24 h intervals, taking the administration time as 0 h.

A particular MAb was detected in sera samples collected at defined time points by the ELISA-based method. Briefly, the microtiter plate (MaxiSorp, Nunc) was coated with TeNT at a concentration of 1 µg/ml (50 µl/well, at 4 °C overnight). After blocking

with 1% BSA/PBS (2 h at RT), samples (sera diluted 1:100 in 1% BSA/PBS) were added into the wells (50 μ l/well, 1 h at RT). Biotin-labeled anti-mouse IgG was used for detection of bound antibodies and extrAvidin-peroxidase/OPD (Sigma Aldrich) was used for the visualization ($A_{492/620}$ recorded). $t_{1/2}$ for particular MAb was determined by taking the assumption that the binding to TeNT detected by ELISA was directly proportional to the concentration of MAb in serum. MAb binding ($A_{492/620}$) recorded in sera collected 8 h upon i.v. treatment was assigned as “initial binding” and taken as proportional to the maximal MAb concentration in the sera (100%). Relative MAb concentration (expressed as a percentage of corresponding maximal MAb concentration) in subsequently collected samples was calculated as: relative MAb concentration = $100 \times A_{492/620}/\text{“initial binding”}$. Time dependent changes in relative MAb concentration were evaluated for each individual mouse and the mean percentages of initial binding at defined time points were calculated. $t_{1/2}$ is determined upon sigmoidal dose response fitting of points within a plot relative MAb concentration = $f(\text{time})$.

2.6. Anti-TeNT MAbs affinity constant determination using ELISA

Determination of MAbs affinity constant (K_a) was performed by using the ELISA based method. Slightly modified procedure described by Friguet et al. (1985) was applied. Briefly, ELISA plate (MaxiSorp, Nunc) was coated (50 μ l/well) with TeNT (1 μ g/ml PBS) by overnight adsorption at 4 °C. A 1% BSA/PBS solution was used for blocking non-specific binding for 2 h at RT. The saturation, as well as each subsequent ELISA step, was followed by washing with 0.05% Tween 20/PBS (4 \times 200 μ l/well). Each of selected MAbs (in final concentration 1 μ g/ml) was mixed with TeNT (final concentration range from 3 to 30 μ g/ml) and incubated for 1 h at RT. Then, TeNT/MAb mixtures were added to the plate and incubated for 1 h at RT. After washing procedure, biotin-labeled anti-mouse IgG was added to the wells (incubation 1 h at RT). The system extrAvidin-peroxidase/OPD (Sigma Aldrich) was used for the “visualization” of MAb binding to adsorbed TeNT. The reaction was stopped by an addition of 2 M H_2SO_4 (50 μ l/well) and the absorbance was read at 492/620 nm ($A_{492/620}$). K_a for particular MAb–TeNT binding was determined by Scatchard analysis modified according to Stevens (1987).

MAb concentration used for K_a determination (1 μ g/ml) was selected from binding curves constructed for each particular MAb ($A_{492/620} = f(\text{MAb concentration})$) by ELISA where the amount of the adsorbed TeNT was the same as for K_a determination). At binding curves, we were looking for the concentration from the upper part of linear range (in order to be above ELISA's limit of detection), which would be equal or lower than the expected value of dissociation constant (1/ K_a ; Friguet et al., 1985).

2.7. Association rate constant (k_{on}) determination

ELISA plates (MaxiSorp, Nunc) were coated with TeNT (1 μ g/ml in PBS, 50 μ l/well) by overnight adsorption at 4 °C. A 1% BSA/PBS solution was used for blocking of non-specific binding (2 h at RT). MAbs diluted in 1% BSA/PBS to the final concentration of 1 μ g/ml ($[\text{MAb}]_0$) were added in 2 min intervals (50 μ l/well) and allow to bind maximally for 14 min at RT. Bound MAbs were detected by biotin-labeled anti-mouse IgG (Sigma Aldrich) diluted in 1% BSA/PBS according to the manufacturer's instruction (50 μ l/well, incubation 1 h at RT). Each incubation step was followed by washing with 0.05% Tween 20/PBS (4 \times 200 μ l/well). ExtrAvidin-peroxidase/OPD (Sigma Aldrich) system was used for visualization and $A_{492/620}$ recording.

Each MAb, in concentration ranging from 0.5 to 0 μ g/ml (double serial dilution), was coated directly onto MaxiSorp (Nunc)

microplate and, upon saturation, detected simultaneously in a same way as MAb bound to TeNT-coated plate. Recorded $A_{492/620}$ values were used for creation of standard curve. Actually, amount of specific MAb bound to TeNT upon defined incubation period ($[\text{bound MAb}]$) was determined from standard curve made, while amount of MAb remains free in solution (unbound MAb) was calculated as $[\text{MAb}]_0 - [\text{bound MAb}]$.

Taking formation of TeNT–MAb complex as a second order reaction where concentration of both reagents are equal, association rate constant (k_{on}) was determined for each particular MAb upon linearization of data points in time vs. $1/[\text{unbound MAb}]$.

2.8. Positioning of selected MAb's epitops with respect to the TeNT's ganglioside-binding site

Position of MAb's epitope with respect to TeNT's ganglioside-binding site was evaluated according to the percentage of specific MAb bound to the TeNT adsorbed directly to the microplate (TeNT system; random orientation of TeNT molecules assumed) and the ones reacted with TeNT bound to the microplates previously coated with G_{D1b} ganglioside (TeNT/ G_{D1b} system; same orientation of TeNT molecules dictated by their interaction with G_{D1b} assumed). MAbs were tested in following ELISA-based assays:

1. TeNT system – ELISA plates (MaxiSorp, Nunc) were coated with TeNT (0.7 μ g/ml in PBS, 50 μ l/well) by overnight adsorption at 4 °C. A 1% BSA/PBS solution was used for blocking of non-specific binding (2 h at RT). The saturation was followed by washing with 0.05% Tween 20/PBS (4 \times 200 μ l/well).
2. TeNT/ G_{D1b} system – ELISA plates (PolySorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with G_{D1b} (SigmaAldrich; 10 μ g/ml in ethanol, 50 μ l/well) by overnight evaporation at RT. Then plates were blocked with 1% BSA/PBS for 2 h at RT. Wells coated only with 1% BSA/PBS (in previous step only 50 μ l of ethanol per well was added) were also included as a control for non-specific TeNT adsorption. The saturation was followed by washing with PBS (4 \times 200 μ l/well). In the next step, TeNT was added (25 μ g/ml in 1% BSA/PBS, 50 μ l/well), and plates were incubated for 1 h at RT. Unbound TeNT was washed-out by 0.05% Tween 20/PBS (4 \times 200 μ l/well).

The concentration of TeNT in solutions used for the MaxiSorp plates coating was selected according to the results of preliminary performed experiments. TeNT/ G_{D1b} system was primarily designed and then TeNT system was adjusted to correspond to it. Namely, we wanted to have the same amount of TeNT to be adsorbed in both systems in order to be able to compare recorded MAbs bindings. For estimation of the TeNT amount in mentioned systems equine polyclonal anti-TeNT antibodies preparation (equine tetanus antitoxin; Institut of Virology, Vaccine and Sera – Torlak, Belgrade, Serbia) was used. We assumed that equine polyclonal anti-TeNT antibodies preparation contains particular MAb specific for a defined epitop in sufficiently low amount to not hamper detection of TeNT. In parallel to preparation of TeNT/ G_{D1b} system as it is described above (ganglioside adsorption onto PolySorp plate, saturation, TeNT binding), MaxiSorp plate was loaded with solutions containing TeNT in various concentration (50 μ l/well) and treated as it is described for TeNT system (left over night at 4 °C, saturated). Both plates are treated simultaneously by equine tetanus antitoxin, biotin labeled anti-equine IgG and extAvidine/peroxidase/OPD. Amount of TeNT in TeNT/ G_{D1b} system was estimated from standard curve $A_{492/620} = f(\text{TeNT concentration})$ constructed from TeNT system (determined TeNT concentration 0.7 μ g/ml). The accuracy of our estimation was rechecked in assay where MaxiSorp and PolySorp plates were prepared as it is described for

TeNT/G_{D1b} and TeNT systems and simultaneously developed by equine tetanus antitoxin, biotin labeled anti-equine IgG and extAvidine-peroxidase/OPD (the same A_{492/620} values were recorded in both systems).

The following steps were the same for both systems and were performed simultaneously: (i) addition of MAbs diluted in 1% BSA/PBS to the final concentration of 10 µg/ml (50 µl/well; incubation 1 h at 37 °C), (ii) detection of bound MAbs by biotin-labeled anti-mouse IgG (Sigma Aldrich) diluted in 1% BSA/PBS according to the manufacturer's instruction (50 µl/well, incubation 1 h at RT), (iii) addition of extrAvidin-peroxidase (Sigma Aldrich) diluted in 1% BSA/PBS according to manufacturer's instruction (50 µl/well, incubation 1 h at RT), (iv) addition of OPD-containing solution (incubation 15 min in dark at RT), (v) reaction ending by the addition of 2 M H₂SO₄ (50 µl/well) and (vi) A_{492/620} recording. Steps (i) – (iii) were followed by washing with 0.05% Tween 20/PBS (4 × 200 µl/well).

A concentration of 10 µg/ml MAb i.e. the use of MAb in rather high concentration was chosen arbitrary in order to be able to detect if there were any binding in TeNT/G_{D1b} system.

2.9. Inhibition of TeNT binding to G_{D1b}

PolySorp ELISA plate (Nunc) was coated with G_{D1b} and saturated with BSA in a same way as in TeNT/G_{D1b} system (see section 2.8). TeNT (25 µg/ml) alone or mixed with specified MAb (10 µg/ml) were pre-incubated for 1 h at RT and added to microplate (50 µl/well, 1 h, RT). The amount of bound TeNT was determined by means of equine tetanus antitoxin (Institut of Virology, Vaccine and Sera – Torlak) and biotin-labeled anti-horse IgG (Sigma Aldrich), appropriately diluted in 1% BSA/PBS. Both incubations lasted for 1 h, were carried out at RT and were followed by washing with 0.05% Tween 20/PBS (4 × 200 µl/well). ExtrAvidin-peroxidase/OPD system (Sigma Aldrich) was used for visualization. Percentage of inhibition of TeNT binding to G_{D1b} by specified MAb was calculated from recorded A_{492/620} values, taking the one recorded in wells incubated with TeNT alone as 100% binding.

2.10. Protective effects of anti-TTd/TeNT MAbs *in vivo*

Protective capacity of selected MAbs was evaluated *in vivo*. Two set of experiments were performed. The experiments were organized as double-blind study.

The day of TeNT injection was assigned as day 0 in both set of experiments. The animals were observed on a daily basis for the next 15 days. The severity in the systemic tetanus with mice that were alive at the moment of observation was graded as follows: 0 – no symptoms of tetanus, 1 – slight stiffness visible only when mouse suspended by tail, 2 – obvious limping, but limb is still used in walking, 3 – obvious limping, limbs still movable but not functional, 4 – extensive stiffness including rigid limbs. Mice that were found dead at the moment of observation got grade 5. In addition, mice having the pathology score 4 at the observation day were euthanized and, recorded for the next day as the one with pathology score 5.

2.10.1. Protectiveness of selected MAbs applied together with TeNT

Mice (10 mice per group) were treated intraperitoneally (i.p.) with 0.5 ml of solution containing:

- 2LD₅₀ TeNT in PBS (group 1)
- 2LD₅₀ TeNT + 10 µg of particular MAb in PBS (groups 2 to 9 assigned as TeNT/MAb26, TeNT/MAb33, TeNT/MAb39, TeNT/MAb41, TeNT/MAb42, TeNT/MAb51, TeNT/MAb62 and TeNT/MAb71)
- PBS alone (group 10 – age-matched normal control group).

All solutions were incubated for 1 h at RT prior injection.

2.10.2. Protectiveness of MAbs applied upon TeNT challenge

MAbs that provided any protection in previous experiment were further examined for protectiveness when they are applied upon TeNT challenge. Mice were treated i.p. with 0.5 ml of solution containing 2LD₅₀TeNT in PBS and 2 h, 6 h or 24 h later received 10 µg of MAb33, MAb39, MAb51 or MAb71. Post-challenge application of selected MAbs was performed via tail vein (10 µg MAbs in 100 µl PBS). Mice were grouped (8–10 mice per group) according to the timing of MAb application and MAb used for the treatment. Group of mice that were treated i.p. with 2LD₅₀ TeNT in 0.5 ml PBS only and group of non-treated age-matched mice were included in the test as control groups.

2.11. Statistical analysis

Statistical significance of the differences recorded among experimental groups was evaluated by T-test (2-tailed) taking a probability (*P*) value of 0.05 as the limit of significance (software: ORIGIN 8.0). The correlation between variables was evaluated by Pearson's bivariate correlation analysis where Pearson's correlation coefficients (*P*_{cc}) were determined (software: IBM SPSS Statistics 20).

3. Results

3.1. Selected MAbs bound epitopes in both H and L chains of TeNT

In our previous work reactivity toward TeNT and TTd has been confirmed for majority of selected MAbs (Inic-Kanada et al., 2009b; Seatovic et al., 2004). Western blot analysis performed upon SDS-electrophoresis of TeNT revealed that selected MAbs, except for MAb42, could have bound various linear epitopes. MAb51 bound only to L chain, while the MAb26, MAb33, MAb39, MAb41, MAb62 and MAb71 seemed promiscuous as they recognized epitopes located both in L and H chains (Fig. 1). For MAb41 and MAb62 bands corresponding their binding to H and L chains were of the similar

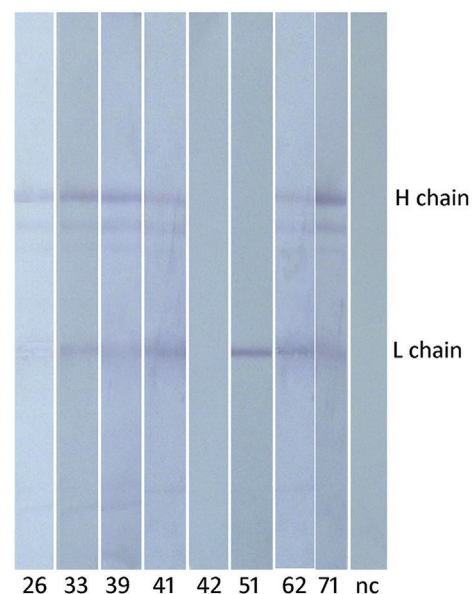


Fig. 1. Western blot analysis of reactivity of MAb26, MAb33, MAb39, MAb41, MAb42, MAb51, MAb62, and MAb71 toward H and L chain of TeNT. TeNT was resolved on 9% polyacrylamide gel by SDS-PAGE under reducing conditions.

intensity, while in case of MAb26, MAb33, MAb39, and MAb71, the binding to TeNT's H chain was more intensive than the binding to L chain.

3.2. Selected anti-TeNT MABs have similar half-life in circulation

The serum $t_{1/2}$ of selected MABs was determined indirectly by following the time-dependant changes in the level of TeNT-specific IgG in serum of mice treated by solution containing one of selected MABs. We assumed that all IgG reactivity toward TeNT in sera samples collected upon the treatment could be ascribed to the injected MAB as the TeNT-specific reactivity of sera collected prior to the treatment was negligible. Time-dependant reductions in MAB sera concentration, reflected by decline in IgG binding to TeNT, are presented at Fig. 2. It was determined upon sigmoidal fitting of data points ($R > 0.96$) that initial, maximal, concentration of each particular MAB has been reduced by half around day 4. The mutual comparisons of the MAB's percentages of initial binding at defined time point showed no significant differences ($P > 0.01$).

3.3. High range of affinities of selected MABs towards TeNT

K_a for each particular MAB–TeNT interaction, determined by Scatchard analysis modified according to Stevens (1987), is presented in Table 1. The affinities of selected MABs to TeNT could be placed in following order: MAB33 > MAB51 \approx MAB42 > MAB62 \approx MAB71 > MAB39 \approx MAB41 > MAB26.

Beside stability of MAB–TeNT complex that is reflected by K_a , the rate of complex forming could also be important in protection. Hence, k_{on} for each particular MAB–TeNT pair was also determined (Table 1). The obtained results showed that MAB33 and MAB51 bound TeNT significantly faster ($P < 0.05$) than other

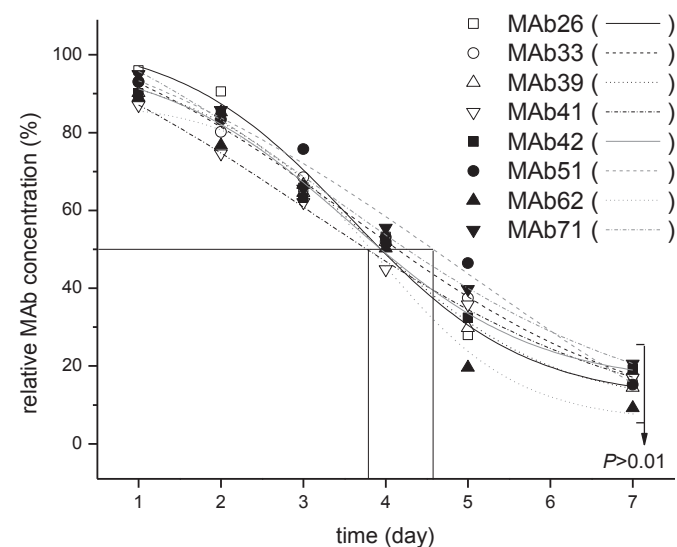


Fig. 2. Time-dependent changes in the binding of TeNT-specific IgG in sera of mice treated via i.v. route by specific MAB/PBS solution (50 μ g MAB/mice). As the reactivity of IgG toward TeNT in sera collected prior to the treatment was negligible, all IgG reactivity toward TeNT in sera samples collected upon the treatment is ascribed to the injected MAB. The binding of injected MAB to TeNT-coated microplates at defined time-point is determined in individual sera ($n = 5$ mice/group). For each mouse, MAB binding recorded in sera collected 8 h upon i.v. treatment was taken as proportional to the maximal MAB concentration in the sera (100%). MAB binding recorded in subsequently collected sera samples is considered as proportional to the relative MAB concentration (expressed as a % of the maximal one) in the sample. Mean relative MAB concentrations at defined time-points ($SE < 10\%$) and corresponding curves obtained by sigmoidal dose response fitting are presented ($R > 0.96$); statistical significance among curves determined by paired T-test.

Table 1
Affinities (K_a) and association rate constants (k_{on}) of selected MABs toward tetanus toxin.

	$K_a^{a,b}$		k_{on}^b	
	($\times 10^8 \text{ M}^{-1}$)	R^2	($\times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	R^2
MAb26	0.4 ± 0.2	>0.91	1.1 ± 0.2	>0.96
MAb33	3.7 ± 0.2	>0.95	118 ± 8	>0.98
MAb39	0.9 ± 0.1	>0.96	47.8 ± 0.8	>0.97
MAb41	0.7 ± 0.1	>0.93	46.3 ± 1.1	>0.96
MAb42	2.1 ± 0.5	>0.94	55.6 ± 0.9	>0.96
MAb51	2.4 ± 0.4	>0.95	185 ± 16	>0.96
MAb62	1.9 ± 0.4	>0.96	20.7 ± 0.8	>0.97
MAb71	1.8 ± 0.6	>0.94	17.1 ± 0.5	>0.98

^a K_a calculated by Scatchard method modified according to Stevens (1987).

^b Mean \pm S.E. of three independently performed measurements are listed.

selected MABs ($k_{on}(\text{MAb33}) = 1.18 \pm 0.08 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{on}(\text{MAb51}) = 1.85 \pm 0.16 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

3.4. Selected MABs differs in prevention of TeNT- G_{D1b} interaction

In order to position the epitope of particular MAB to TeNT's ganglioside-binding site, binding of selected MABs to TeNT- G_{D1b} complex was analyzed. The hypothesis was that binding to the epitope located in, overlapping with, or in close proximity to the ganglioside-binding site could be impaired by TeNT- G_{D1b} complex formation. Actually, we compared binding characteristics of selected MABs (i) to TeNT complexed with G_{D1b} and (ii) to the same amount of TeNT adsorbed directly onto microplate. It was shown in a preliminary experiment that selected MABs did not interact with G_{D1b} (data not shown). TeNT- G_{D1b} interaction impaired to different extent binding of selected MABs to TeNT (Fig. 3A). Formation of TeNT- G_{D1b} complex exerted the lowest impact on MAB42's and MAB62's binding to TeNT while bindings of MAB33 and MAB39 were almost completely impaired (reduced to < 5% of binding to TeNT).

The analysis if these eight selected MABs were able to inhibit binding of TeNT to ganglioside molecules, presented in Fig. 3B, showed that pre-incubation of TeNT with MAB41 or MAB51 resulted in almost complete inhibition of its binding to G_{D1b} while MAB42 and MAB62 were not able to inhibit TeNT- G_{D1b} interaction.

Pearson's bivariate correlation analysis confirmed negative correlation between the capability of selected MABs to inhibit binding of TeNT to G_{D1b} and their binding to TeNT adsorbed onto microplate pre-coated with G_{D1b} , i.e. G_{D1b} -TeNT complex ($P_{cc} = -0.679$, $P = 0.035$ for 1-tailed analysis). In addition, in the presented experimental settings neither capability of MABs to inhibit binding of TeNT to G_{D1b} nor their interaction with G_{D1b} -TeNT complex correlated significantly to the affinity towards TeNT ($P_{cc} = -0.007$, $P = 0.988$ and $P_{cc} = -0.086$, $P = 0.839$, respectively) or k_{on} ($P_{cc} = 0.586$, $P = 0.127$ and $P_{cc} = -0.468$, $P = 0.243$, respectively).

3.5. Four out of eight selected MABs, applied together with TeNT, exert a protective capacity

Follow-up of tetanus-related pathology in mice treated i.p. with lethal dose of TeNT mixed with one of the eight selected MABs, showed that MAB33, MAB39, MAB51 and MAB71 had protective capacity (Fig. 4).

MAb26, MAb41, MAb42, and MAb62 exerted only a weak potential to initially ameliorate symptoms of tetanus (Fig. 4). At the very beginning of the post-challenge follow-up period, the pathology scores were transitionally better in mice treated with TeNT pre-incubated with these MABs comparing to the mice treated with TeNT alone (Fig. 4). However, the initially observed beneficial

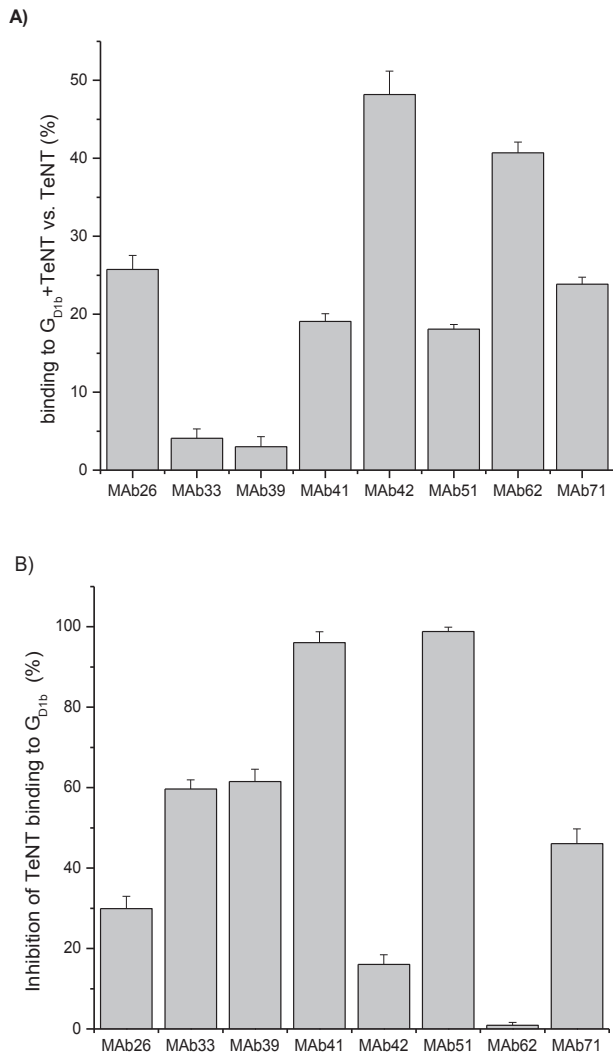


Fig. 3. Binding of the selected MABs to TeNT adsorbed onto ganglioside G_{D1b} (A) and its potential to inhibit binding of TeNT to G_{D1b} (B). In plot A results are presented as a percentage of specific MAB binding to the same amount of TeNT directly adsorbed on the microtiter plate (100% binding) while plot B represent percentages of TeNT bound to G_{D1b} upon 1 h long incubation with specified MAB (binding of TeNT incubated under the same condition without any MAB was taken as 100%). Samples are assessed in triplicates and results presented as mean \pm S.E.

effects faded away, and pathology scores after 4th day did not differ significantly from the ones recorded in the group treated with TeNT alone. All animals treated with TeNT/MAB26, TeNT/MAB41, TeNT/MAB42 and TeNT/MAB62 mixtures died after the treatment (until day 5).

Regarding MABs that exerted some protective potential, obtained results implied on MAB51 as superior (Fig. 4). At the very beginning of the follow-up period (first 5 days), mean pathology scores recorded in TeNT/MAB33 group were significantly better than the ones recorded for TeNT/MAB51 treated mice ($P = 0.039$). However, only in TeNT/MAB51 group all mice survived two-week long follow up period (survival rate 100%). Moreover, all TeNT/MAB51-treated mice were completely recovered on day 6. In TeNT/MAB33, TeNT/MAB39, and TeNT/MAB71 groups survival rates were 80%, 80% and 60%, respectively (Fig. 5A, white bars). In these groups, mice went dead between day 5 and day 8. The rest of the mice in TeNT/MAB33 (Fig. 5B, dotted line) and TeNT/MAB39 (Fig. 5D, dotted line) groups completely recovered during follow up period while in TeNT/MAB71 group 2 out of 6 alive mice still had

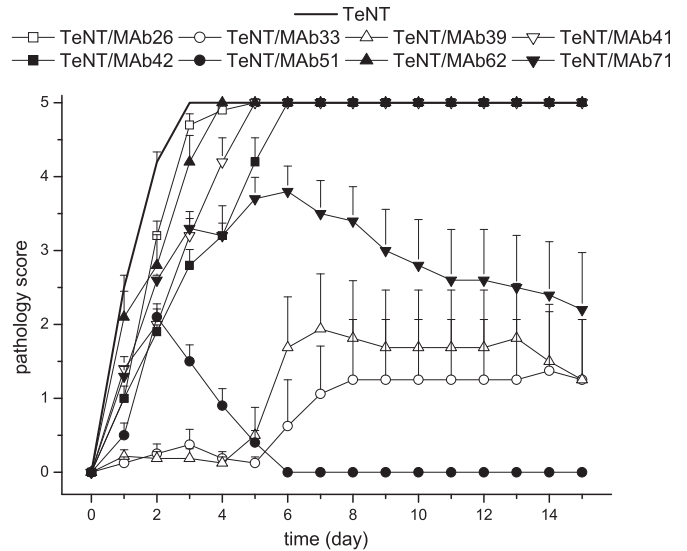


Fig. 4. Pathology scores in mice treated with lethal dose of TeNT ($2LD_{50}$) alone or mixed with TeNT-specific MAB ($10 \mu\text{g}$). Mean pathology scores were calculated for all mice in the group (euthanized mice were recorded with pathology score 5 till the end of follow up period Day of treatment is assigned as day 0. Mice (10 per group) were monitored for 15 days and mean pathology scores \pm S.E. at defined time points are presented. The severity in the systemic tetanus was graded as follows: 0 – no symptoms of tetanus, 1 – slight stiffness visible only when mouse suspended by tail, 2 – obvious limping, but limb is still used in walking, 3 – obvious limping, limbs still movable but not functional, 4 – extensive stiffness including rigid limbs, 5 – dead.

slight symptoms of tetanus (pathology score 1) by day 15 (Fig. 5E, dotted line).

Taking into account only mice that survived *in vivo* TeNT challenge (Fig. 5, plots B to E, dotted lines), the worst clinical picture was observed with TeNT/MAB71 treated mice during whole follow up period (1st week: $P < 0.0005$ vs. MAB33/TeNT and MAB39/TeNT groups, $P < 0.05$ vs. MAB51/TeNT; 2nd week: $P < 0.005$ vs. MAB33/TeNT and MAB51/TeNT groups, $P < 0.05$ vs. MAB39/TeNT). During the 2nd week of follow up period, clinical picture with TeNT/MAB33 treated mice that stayed alive was similar to those with TeNT/MAB51, while recovery of TeNT/MAB39 mice was slower ($P < 0.005$).

3.6. Timing of MAB application significantly influences the severity of clinical picture

In reality therapeutic is applied upon TeNT intoxication. In order to mimic that situation we tested MABs that provided any protection when applied together with TeNT for protectiveness when they are applied upon TeNT challenge. MAB33 (Fig. 5B) and MAB51 (Fig. 5D) were tested for protectiveness when they were applied 2 h, 6 h and 24 h upon TeNT intoxication. With MAB39 (Fig. 5C) and MAB71 (Fig. 5E) 24 h post-challenge testing was not performed as we had recorded survival rate less than 50% when they were applied closer (6 h) to TeNT intoxication (Fig. 5A). The obtained results show that prolongation of period between TeNT intoxication and MAB administration positively correlates to both decline in survival rate (Fig. 5A) and severity of clinical picture with mice being alive at the moment of observation (Fig. 5B to E). Comparison of mean pathology scores for mice being alive at the moment of observation showed that the ones treated within post-challenge period had more pronounced pathology comparing to those treated with pre-incubated mixture of corresponding MAB and TeNT (paired T-test: pre-incubated MAB33 vs. all tested time points $P < 0.000001$; pre-incubated MAB39 vs. all tested time points $P < 0.000001$; pre-incubated MAB51 vs. all

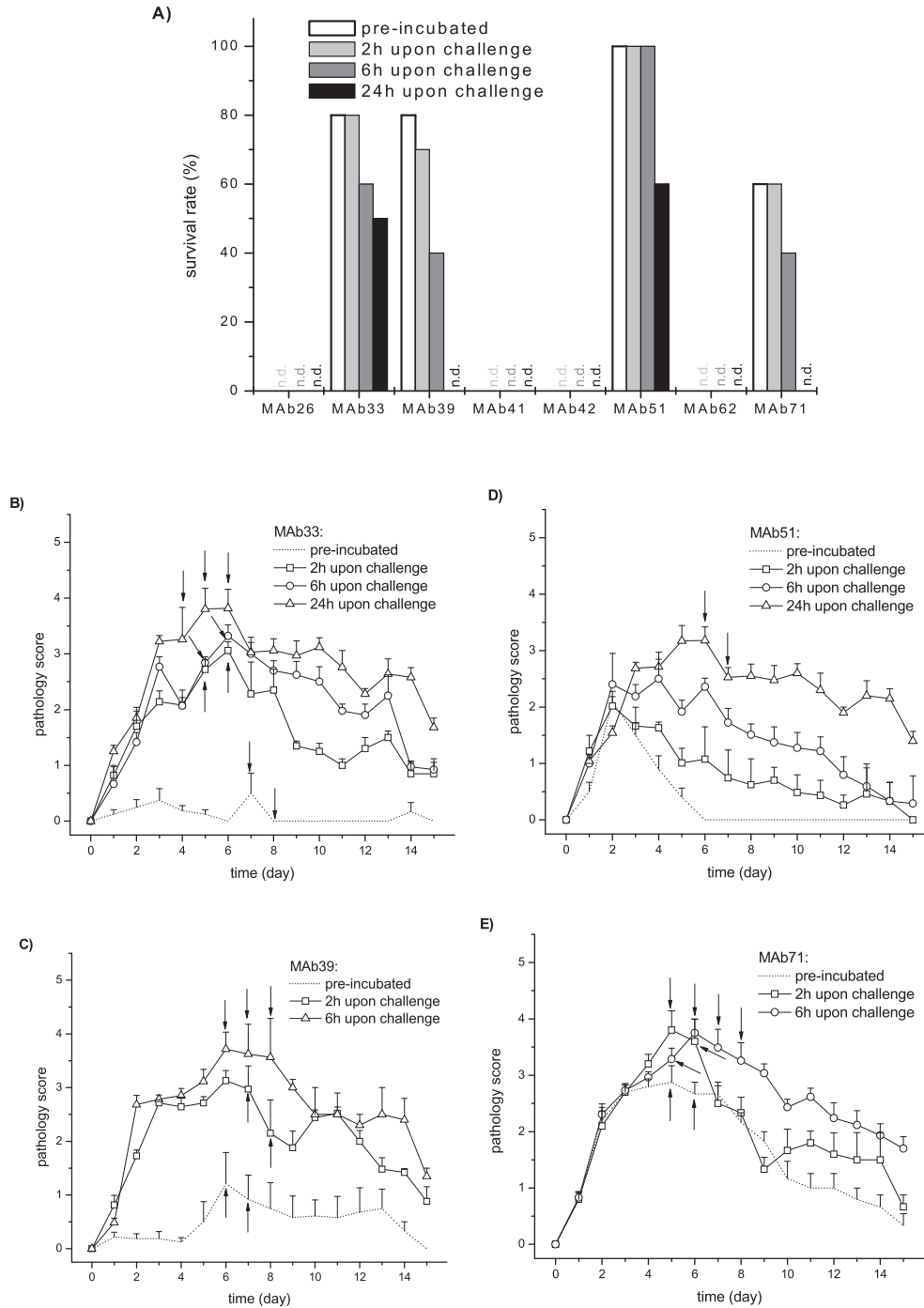


Fig. 5. Survival rates (A) and pathology scores (B–E) recorded in mice i.p. treated with preincubated TeNT + anti-TeNT MAb mixture (2LD₅₀ TeNT + 10 μg MAb; dotted lines) or i.p. treated with 2LD₅₀ TeNT and 2 h, 6 h or 24 h later by i.v. administration of MAb (10 μg). Post-challenge time-dependant changes in mean pathology scores of MAB33- (B), MAB39- (C), MAB51- (D) and MAB71-treated (E) mice are presented. Results are presented as mean pathology scores ± S.E at defined time-point. Only mice being alive at the moment of observation were taken into account for calculation of mean pathology scores presented in plots B – E. Day of treatment is assigned as day 0 and mice (8–10 per group) were monitored for 15 days. The severity in the systemic tetanus was graded as follows: 0 – no symptoms of tetanus, 1 – slight stiffness visible only when mouse suspended by tail, 2 – obvious limping, but limb is still used in walking, 3 – obvious limping, limbs still movable but not functional, 4 – extensive stiffness including rigid limbs, 5 – dead; black arrows indicate days when mice dying occurred.

tested time points $P < 0.00005$; pre-incubated MAB71 vs. 2 h $P = 0.35$, vs. 6 h $P = 0.026$). Furthermore, there were significant differences in severity of pathology among groups treated with MAB33 (paired T-test: 2 h vs. 6 h $P = 0.0035$, 2 h vs. 24 h $P < 0.000001$, 6 h vs. 24 h $P = 0.00004$) and MAB51 (paired T-test: 2 h vs. 6 h $P = 0.0001$, 2 h vs. 24 h $P = 0.00001$, 6 h vs. 24 h $P = 0.00026$) upon TeNT intoxication.

3.7. Among MABs with K_a in $10^8 M^{-1}$ range there is a good correlation between their protective potential and the ability to prevent TeNT-ganglioside interaction

Results obtained *in vitro* were correlated to survival rate recorded *in vivo* in mice treated with pre-incubated mixture of specific MAb and TeNT lethal dose. Survival rate was taken as a main

criterion for estimation of particular MAb protectiveness. Summary of the obtained results is presented on Fig. 6. Comparison of the values obtained in four *in vitro* tests for MABs providing some protection (MAB33, MAB39, MAB51 and MAB71) with those recorded for MABs that did not provide any protection (MAB26, MAB41, MAB42 and MAB62) revealed no statistically significant difference.

Obtained results showed that protective MABs recognize TeNT with $K_a \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and $k_{on} \geq 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, and could reduce its binding to G_{D1b} for $\geq 50\%$ (Fig. 6). Correlation analysis for MABs grouped according to the criterion $K_a \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (MAB26 and MAB41 excluded from the analysis) revealed that survival rate significantly correlates to binding to G_{D1b} -TeNT complex (negative correlation, $P_{cc} = -0.883$, $P = 0.020$) and capability of MAB to prevent formation of TeNT- G_{D1b} complex (positive correlation, $P_{cc} = 0.972$, $P = 0.028$). In addition, for protection by antibodies having $K_a \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ their ability to prevent TeNT-ganglioside interaction is more important than affinity per se (survival rate vs. K_a $P_{cc} = 0.426$, $P = 0.574$). Grouping of tested MABs according to others mentioned criteria ($k_{on} \geq 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, MAB26 excluded; reduction of TeNT to G_{D1b} for $\geq 50\%$, MAB26, MAB42 and MAB62 excluded) did not reveal any significant correlation between survival rate and values recorded in *in vitro* testing.

4. Discussion

We evaluated binding characteristics of eight murine MABs to TeNT, and their protective potential *in vivo*. Our results strongly imply that both characteristics: the affinity toward TeNT and the ability to prevent TeNT-ganglioside interaction are important for a single MAB to be protective *in vivo*.

Although all selected MABs belong to murine IgG1 subclass (Seatovic et al., 2004) slight differences in their protein sequences as well as glycosylation pattern could affect their effector potential (Ackerman et al., 2013; Jefferis, 2009), as well as serum half-life (Hinton et al., 2006; Wang et al., 2008, 2011). Half-life of a single MAB in circulation represents an important pharmacokinetic parameter as it reflects time-dependent changes in effective MAB concentration and thus directly influences its therapeutic effectiveness (Wang et al., 2008). In our experimental setting this could not be explanation for significant differences in protective potential of selected MABs as we showed that all selected MABs have similar

half-life in circulation.

Further research was focused on MAB-TeNT interaction. The attention was paid on the affinity of selected MABs and fine epitope specificity as key factors determining efficacy of MAB-based therapeutics (Igawa et al., 2011). Regarding protection against tetanus, available data imply that key players are TeNT-specific neutralizing antibodies (Aggerbeck et al., 1996) and that their ability to prevent TeNT binding to the neurons, a first step in TeNT intoxication, could be of high importance.

Although all of the selected MABs bind TeNT with the affinity that allows TeNT neutralization in solution we clearly showed that the chosen MABs possessed significantly different protective capacities. Recorded survival rate in mice treated with TeNT pre-incubated with MAB42 and MAB62 showed that high affinity per se did not mean that such MAB was protective. On the other hand, the comparison of the survival rate with TeNT/MAB41 and TeNT/MAB51 treated mice indicated that the affinity factor could also be taken into account. MAB41 and MAB51 have one order of magnitude difference in K_a , but both MABs are able to completely inhibit *in vitro* TeNT binding to G_{D1b} , when sufficient time was allowed for their interaction with TeNT. However, in *in vivo* conditions where exist 1) a balance between TeNT binding to a particular MAB and to ganglioside-containing receptor complex, and 2) the receptor mediated TeNT internalization that favors TeNT binding to the neurons, MAB51 was a superior antibody.

Gangliosides of G_{1b} series are shown as important for TeNT binding to neurons (Chen et al., 2009; Montecucco et al., 1988). Several studies have already shown that Hc fragment of TeNT was successively used for the induction of protective immune response in animals (Yu et al., 2011) and that preservation of ganglioside-binding site within Hc positively correlates with its potential to evoke the protective immune response (Quazi et al., 2006). In addition, MABs directed towards ganglioside-binding sites have been shown as effective in protection against tetanus (Fitzsimmons et al., 2000; Quazi et al., 2006). These MABs exert protective effect by masking TeNT's ganglioside-binding sites, which blocks toxin binding and subsequent entry into target cells. Binding of selected MABs' to TeNT adsorbed onto G_{D1b} imply that target epitopes of MAB33 and MAB39 lie in very close proximity to the ganglioside-binding site(s) while epitopes of MAB42 and MAB62 are located further away on TeNT molecule. Formation of G_{D1b} -TeNT complex also resulted in steric hindrances for binding of MAB26, MAB41,

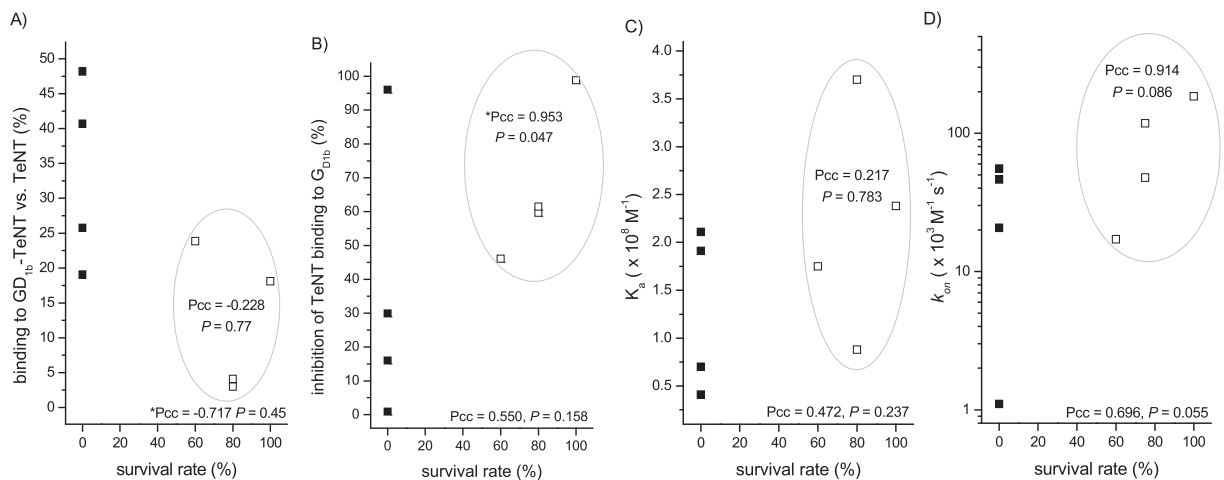


Fig. 6. Correlations of survival rates recorded in mice treated with pre-incubated MAB/TeNT mixtures and bindings to G_{D1b} + TeNT complex (A), abilities to prevent G_{D1b} -TeNT interaction (B), MABs' affinities towards TeNT (C) and TeNT association rate constants (D). Results of Pearson's bivariate correlation analysis performed for all MABs are indicated in lower right corner of the plots. Results of the analysis performed for MABs that provided any protection (open symbols) are also indicated on the plot. Statistical significance of correlation $^*P < 0.05$.

MAb51 and MAb71 but they were less pronounced than with MAb33 and MAb39. However, taking only steric factors into account, the total inhibition of TeNT-ganglioside interaction upon TeNT pre-incubation with MAb41 and MAb51 seem to contradict their binding to solid-phase adsorbed TeNT-G_{D1b} complex. However, in the case of MAbs binding to TeNT-G_{D1b} complex conformational changes in TeNT upon its interaction with G_{D1b} could lead to the generation of neo-epitopes (Steinem et al., 1997; Winter et al., 1996). In addition, binding of TeNT to G_{D1b} via one of its two ganglioside-binding sites (Fotinou et al., 2001) could leave enough room for MAb41 or MAb51 binding. On the other hand, in the case of MAb–TeNT pre-incubation recorded inhibition could be the sum of the steric hindrance and changes in 3D structure of ganglioside-binding site due to MAb binding (Scott et al., 2010).

In light of MAb51 specificity to L chain of TeNT, the finding that MAb51 was protective *in vivo* could seem unexpected. However, it was already demonstrated by Vilks et al. (1984) that MAbs, which could provide protection against tetanus target epitopes located all over the TeNT molecule. In addition, Cheng et al. (2009) showed that MAb directed to L chain of botulinum neurotoxin (toxin with similar structure and mode of action as TeNT) inhibited entry of the toxin into neuron and provided protection. Both cited cases imply that literary masking of ganglioside-binding sites is not the only way to prevent interaction of clostridial neurotoxin (including TeNT) with the target cell. As exclusive reactivity of MAb51 with denaturated L chain in Western blot does not exclude possibility that in real conditions, where native TeNT is available, MAb51 interacts with a certain conformational epitope that could be apart of L chain, two protective mechanisms proposed by Cheng et al. (2009) could be applicable to MAb51: inhibition of toxin neutralization due to the steric hindrance and enhanced toxin clearance by the immune system because of the effective immunocomplex formation. In addition, binding of MAb to an epitope located distally from the ganglioside-binding site could lead to the changes in TeNT's tertiary structure (comprising the changes in conformation of ganglioside-binding site) with the reduction of affinities toward ganglioside as the final outcome (Scott et al., 2010). However, based on our current data we are not able to draw a final conclusion, which of the aforementioned mechanisms is predominant in the case of MAb51.

Since only animals treated with TeNT mixed with MAbs having $K_a \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ survived (TeNT/MAb33, TeNT/MAb39, TeNT/MAb51 and TeNT/MAb71 groups), we suggest that affinity of MAb–TeNT interaction has to be the first criterion for a MAb to be assigned as protective with cut-off value set at $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Pearson's bivariate correlation analysis performed for MAbs having K_a in 10^8 M^{-1} range imply that further selection has to be made according to the ability to prevent TeNT-ganglioside interaction. We suggest the assessment of MAb's ability to prevent TeNT-G_{D1b} complex formation as a second discrimination assay and this is based on: (i) the ability of MAb having $K_a \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ to prevent formation of TeNT-G_{D1b} correlate with survival rate better than its binding to TeNT-G_{D1b} complex, (ii) for MAbs that interact with an epitope positioned distally from ganglioside-binding site but prevent TeNT-G_{D1b} complex formation by induction of conformational changes encompassing ganglioside-binding site (Scott et al., 2010) there is a high probability of binding to TeNT-G_{D1b} complex, and (iii) prevention of TeNT-G_{D1b} mimics more reliable mechanism responsible for protection *in vivo* (Quazi et al., 2006). The proposed selection criteria are in line with those proposed by Marks (2004) for MAbs expected to provide protection against botulinum toxin. Marks also pointed that MAb's affinity is crucial while precise target epitope or even domain seems to be much less important (in his lab it was later confirmed that MAb targeting non-Hc domain of botulinum toxin prevents its internalization, Cheng et al., 2009).

Our results also imply that higher association rate i.e. initially faster binding of TeNT to MAbs that could inhibit its binding to receptor complex on neuron could be beneficial in protection against tetanus. Significantly better clinical picture during the follow-up period and higher survival rate in TeNT/MAb39 group comparing to TeNT/MAb71 group, might be explained by higher k_{on} for MAb39–TeNT interaction. These two MAbs possess similar ability to prevent TeNT-G_{D1b} interaction but MAb39 provided better protection in spite of the lower affinity. However, characteristics of MAbs used in this study do not allow us to discuss with certainty on the importance of k_{on} of MAb–TeNT interaction in protection against TeNT.

In this paper we suggest the potential way to overcome the main obstacle connected with anti-TeNT MAbs, e.g. how to identify MAb of desired specificity/protectiveness, as this process is frequently difficult, too expensive, and too time consuming. We find our approach on how to select the protective MAb out of wide TeNT-specific MAbs easy and potentially applicable not only for murine MAbs produced by hybridoma technology but also for human and humanized TeNT-binding fragments (Ab, Fab, F(ab)₂, scFv) obtained by techniques based on recombinant technologies.

5. Conclusion

Selection of protective anti-TeNT antibody or TeNT-binding fragments may be performed by *in vitro* testing by a combination of two assays: (i) the measurement of MAb affinity toward TeNT taking $K_a 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ as a threshold level and (ii) the evaluation of its capability to prevent TeNT-ganglioside interaction. Correlations between binding properties of eight selected MAbs and their protectiveness *in vivo* imply that for discrimination between protective and non-protective anti-TeNT Abs, both parameters have to be taken into consideration. High affinity binding of MAb to TeNT or its specificity toward TeNT's ganglioside-binding site alone does not necessary mean that it would be protective *in vivo*. Single MAb could be regarded as a potential therapeutic only if able to completely inhibit TeNT-ganglioside complex formation.

Ethical statement

All animal experiments described in our manuscript “*Key protection factors against tetanus: Anti-tetanus toxin antibody affinity and its ability to prevent tetanus toxin — ganglioside interaction*” conformed to the Serbian laws and European regulations on animal welfare and were approved by the committee section at the Institute of Virology, Vaccines and Sera —Torlak and by the Ethics Committee for the Welfare of Experimental Animals of Republic Serbia (Approval No. 011-00-00510/2011-05/5).

Acknowledgment

This research has been supported by Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (grant no. 172049). The authors thank Slobodan Zivkovic for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.025>.

Transparency document

The transparency document associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon>.

2015.06.025.

References

- Ackerman, M.E., Crispin, M., Yu, X., Baruah, K., Boesch, A.W., et al., 2013. Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity. *J. Clin. Invest.* 123, 2183–2192.
- Aggerbeck, H., Wantzin, J., Heron, I., 1996. Booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. *Comp. Three Differ. Vaccine formulations – III. Vaccine* 14, 1265–1272.
- Chen, C., Fu, Z., Kim, J.J.P., Barbieri, J.T., Baldwin, M.R., 2009. Gangliosides as high affinity receptor for tetanus neurotoxin. *J. Biol. Chem.* 284, 26569–26577.
- Cheng, L.W., Stanker, L.H., Henderson, T.D., Lou, J., Marks, J.D., 2009. Antibody protection against botulinum neurotoxin intoxication in mice. *Infect. Immun.* 77, 4305–4313.
- Committee for proprietary medicinal products, 2002. Note for Guidance on Production and Quality Control of Animal Immunoglobulins and Immunoserum for Human Use. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – Evaluation of Medicines for Human Use ref. no. CPMP/BWP/3354/99. Available: <http://www.tga.gov.au/pdf/euguide/bwp335499en.pdf>.
- Fitzsimmons, S.P., Clark, K.C., Wilkerson, R., Shapiro, M.A., 2000. Inhibition of tetanus toxin fragment C binding to ganglioside G_{T1b} by monoclonal antibodies recognizing different epitopes. *Vaccine* 19, 114–121.
- Fotinou, C., Emsley, P., Black, I., Ando, H., Ishida, H., et al., 2001. The crystal structure of tetanus toxin H_c fragment complexed with a synthetic G_{T1b} analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin. *J. Biol. Chem.* 276, 32274–32281.
- Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L., Goldber, M.E., 1985. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* 77, 305–319.
- German-Fattal, M., German, A., Bizzini, B., 1987. Relation between protective potency and specificity of antibodies in sera of tetanus immunized individuals. *Eur. J. Epidemiol.* 1–3, 119–122.
- Hassel, B., 2013. Tetanus: pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. *Toxins* 5, 73–83.
- Hinton, P.R., Xiong, J.M., Johlf, M.G., Tang, M.T., Keller, S., Tsurushita, N., 2006. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J. Immunol.* 176, 346–356.
- Igawa, T., Tsunoda, H., Kuramochi, T., Sampei, Z., Ishii, S., Hattori, K., 2011. Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. *mAbs* 3, 243–252.
- Inic-Kanada, A., Stojanovic, M., Zivkovic, I., Kosec, D., Micic, M., Petrusic, V., Zivanovic-Simonovic, S., Dimitrijevic, L., 2009a. Murine monoclonal antibody 26 raised against tetanus toxoid cross-reacts with β_2 -glycoprotein I: its characteristics and role in molecular mimicry. *Am. J. Rep. Immunol.* 61, 39–51.
- Inic-Kanada, A., Stojanovic, M., Zivkovic, I., Petrusic, V., Dimitrijevic, L., 2009b. The monoclonal antibody 26 raised against tetanus toxoid also recognizes tetanus toxin and β_2 -glycoprotein I – its binding properties in vitro and potential applications. *J. Serb. Chem. Soc.* 74, 245–257.
- Jefferis, R., 2009. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 8, 226–234.
- Lang, A.B., Cryz, S.J., Schurch, U., Ganss, M.T., Bruderer, U., 1993. Immunotherapy with human monoclonal antibodies. Fragment A specificity of polyclonal and monoclonal antibodies is crucial for full protection against tetanus toxin. *J. Immunol.* 151, 466–472.
- Louch, H., Buczko, E.S., Woody, M.A., Venable, R.M., Vann, W.F., 2002. Identification of a binding site for ganglioside on the receptor binding domain of tetanus toxin. *Biochemistry* 41, 13644–13652.
- Marks, J.D., 2004. Dechipering antibody properties that lead to potent botulinum neurotoxin neutralization. *Mov. Disord.* 19 (Suppl. 8), S101–S108.
- Matsuda, M., Kamei, M., Sugimoto, N., Ma, Y., Hashizume, S., 1992. Characteristics of toxin-neutralization by anti-tetanus human monoclonal antibodies directed against the three functional domains [A], [B] and [C] of the tetanus toxin molecule and a reliable method for evaluating the protective effects of monoclonal antibodies. *Eur. J. Epidemiol.* 8, 1–8.
- Montecucco, C., Schiavo, G., Gao, Z., Baurlein, E., Boquet, P., Dasgupta, B.R., 1988. Interaction of botulinum and tetanus toxins with the lipid bilayer surface. *Biochem. J.* 251, 379–383.
- Mould, D.R., Sweeney, K.R.D., 2007. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies – mechanistic modeling applied to drug development. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* 10, 84–96.
- Quazi, O., Sesardic, D., Tierney, R., Soderback, Z., Crane, D., Bolgiano, B., Fairweather, N., 2006. Reduction of the ganglioside binding activity of the tetanus toxin H_c fragment destroys immunogenicity: implications for development of novel tetanus vaccines. *Infect. Immun.* 74, 4884–4891.
- Scott, N., Quazi, O., Wright, M.J., Fairweather, N.F., Deonarain, M.P., 2010. Characterisation of a panel of anti-tetanus toxin single chain Fvs reveals cooperation binding. *Mol. Immunol.* 47, 1931–1941.
- Seatovic, S., Inic-Kanada, A., Stojanovic, M., Zivkovic, I., Jankov, R.M., Dimitrijevic, L., 2004. Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for determination of tetanus toxoid concentration. *J. Immunoass. Immunochem.* 25, 31–44.
- Steinem, C., Sieber, M., ElBava, A., Schmidt, M.A., Galla, H.J., 1997. Quartz crystal microbalance investigation of the interaction of bacterial toxins with ganglioside containing solid supported membranes. *Eur. Biophys. J.* 26, 261–270.
- Stevens, F.J., 1987. Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody. *Mol. Immunol.* 24, 1055–1060.
- Stojicevic, I., Dimitrijevic, L., Dovezenski, N., Zivkovic, I., Petrusic, V., Marinkovic, E., Inic-Kanada, A., Stojanovic, M., 2011. Tetanus toxoid purification: chromatographic procedures as an alternative to ammonium-sulphate precipitation. *J. Chrom. B* 879, 2213–2219.
- Taylor, A.M.F.R.C.A., 2006. *Tet. Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care. Pain* 6, 101–104.
- Tetanus, 2012. In: Atkinson, W., Wolfe, S., Hamborsky, J. (Eds.), *Epidemiology and Prevention of Vaccine-preventable Diseases*. Public Health Foundation, Centers for Disease Control and Prevention, Washington DC, pp. 291–300.
- Vilk, W.A., Bizzini, B., Snyder, R.M., Bernhard, E., Wagner, R.R., 1984. Neutralization of tetanus toxin by distinct monoclonal antibodies. Binding to multiple epitopes on the toxin molecule. *Infect. Immun.* 45, 604–609.
- Wang, W., Wang, E.Q., Balthasar, J.P., 2008. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharm. Ther.* 84, 548–558.
- Wang, W., Lu, P., Fang, Z., Hamuro, L., Pittman, T., et al., 2011. Monoclonal antibodies with identical Fc sequence can bind to FcRn differently with pharmacokinetic consequence. *Drug Metabol. Disp.* 39, 1469–1477.
- Winter, A., Ulrich, W.P., Wetterich, F., Weller, U., Galla, H.J., 1996. Gangliosides in phospholipid bilayer membranes: interaction with tetanus toxin. *Chem. Phys. Lipids* 81, 21–34.
- World Health Organization, 2010. WHO Technical Note: Current Recommendations for Treatment of Tetanus during Humanitarian Emergencies. WHO ref. no. WHO/HSE/GAR/DCE/2010.2. Available: http://www.who.int/diseasecontrol_emergencies/publications/who_hse_gar_dce_2010.2/en/.
- Yu, R., Yi, S., Yu, C., Fang, T., Liu, S., et al., 2011. A conformational change of C fragment of tetanus neurotoxin reduces its ganglioside-binding activity but does not destroy its immunogenicity. *Clin. Vaccine. Immunol.* 18, 1668–1672.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Ивана Д. Лукић (рођена Стојићевић) рођена је 22.04.1984. године у Пожаревцу, Република Србија.

Ивана Лукић је уписала студије на Хемијском факултету Универзитета у Београду, смер Биохемија, школске 2003/04. године, а дипломирала је 2010. године, са средњом оценом 7,88 и оценом на дипломском испиту 10. Експериментални део дипломског рада под називом „Пречишћавање и карактеризација тетанус токсоида“ урађен је у Одсеку за научно-истраживачки рад Института за вирусологију, вакцине и серуме - Торлак у Београду.

У складу са Болоњском Конвенцијом године 2010/11. уписала је дипломске академске студије - мастер на Хемијском факултету Универзитета у Београду, које је завршила 2011. године са средњом оценом 9,80 и са оценом 10 на завршном испиту. Експериментални део мастер рада под називом „Пречишћавање тетанус токсоида: хроматографске технике као алтернатива преципитацији амонијум сулфатом“ урађен је у Одсеку за научно-истраживачки рад Института за вирусологију, вакцине и серуме – Торлак, Београд. Укупна средња оцена по завршетку студија је 8,13.

Докторске студије уписала је на Хемијском факултету Универзитета у Београду школске 2011/12. године.

Од 2010. године Ивана Лукић је запослена као истраживач приправник у Одсеку за научно-истраживачки рад Института за вирусологију, вакцине и серуме – Торлак у Београду, а од 2013. године као истраживач сарадник у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије: Алергени истраживања предвиђених пројектом, антитела, ензими и мали физиолошки значајни молекули: дизајн, структура, функција и значај (ОИ172049).

До данас је објавила 14 научних радова у међународним часописима, од тога 2 рада из докторске тезе као први аутор, један М21, а други М22 категорије.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписана **Ивана Лукић**

Број индекса ДБ07/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под називом:

Терапеутски потенцијал анти-тетанус токсонд моноклонских антитела:

примена заснована на везивним карактеристикама

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација ни у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 11.06.2018.

Потпис докторанда

Ивана Лукић

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора	Ивана Лукић
Број индекса	ДБ07/2011
Студијски програм	Биохемија
Наслов рада	Терапеутски потенцијал анти-тетанус токсоид моноклонских антитела: примена заснована на везивним карактеристикама
Ментор	др Маријана Стојановић
Потписани/а	Ивана Лукић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 11.06.2018.

Потпис докторанда

Ivana Lukic

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку "Светозар Марковић" да у дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Терапеутски потенцијал анти-тетанус токсоид моноклонских антитела:
примена заснована на везивним карактеристикама**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 11.06.2018.

Потпис докторанда

Ованко Јукић

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство - некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално - без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

5. Ауторство - без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода