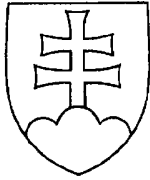


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 089

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C12N 1/20

- (21) Číslo prihlášky: **1511-98**
(22) Dátum podania prihlášky: **19. 9. 1990**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **4. 2. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2003**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **3931236, 4015911**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **19. 9. 1989, 17. 5. 1990**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE, DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **13. 4. 1999**
Vestník ÚPV SR č.: **04/1999**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **27. 12. 2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky: **4560-90**
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:

(73) Majiteľ: **Max-Planck Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V., Göttingen, DE;**
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, Heidelberg, DE;

(72) Pôvodca: **Simon Markus M., Freiburg, DE;**
Schaible Ulrich E., St. Louis, MO, US;
Eichmann Klaus, Freiburg, DE;
Kramer Michael, Heidelberg, DE;
Reinhard Wallich, Heidelberg, DE;

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Patogénny mikroorganizmus *B. burgdorferi* a spôsob jeho izolácie a rekultivácie**

(57) Anotácia:
Je opísaný patogénny mikroorganizmus *B. burgdorferi*, ktorý je dôležitý pri výrobe očkovacej látky proti borelióze, ktorá obsahuje jednu alebo väčší počet protilátok pre antigén 31 kD (OspA) a/alebo 34 kD (OspB) *B. burgdorferi*. Taktiež je uvedený spôsob izolácie a rekultivácie patogénneho organizmu z imunodeficientných pokusných zvierat.

Oblasť techniky

Vynález sa týka patogénneho mikroorganizmu *B. burgdorferi*. Vynález sa taktiež týka spôsobu izolácie a rekultivácie patogénneho organizmu z imunodeficientných pokusných zvierat.

Doterajší stav techniky

Borrelióza-Lyme je v súčasnosti najčastejším infekčným ochorením, ktoré sa prenáša kliešťami. Toto ochorenie je vyvolávané spirochetou *Borrelia burgdorferi*, tento mikroorganizmus sa prenáša na človeka predovšetkým kliešťami kmeňa Ixodes. Ochorenie je chronická progresívna infekcia, napadajúca množstvo orgánov ako je koža, centrálny a periférny nervový systém, srdce, pečeň, ľadviny a svalový a kostný systém. Vzhľadom na to, že dostatočná liečba tohto ochorenia antibiotikami je ťažká, je v súčasnej dobe uskutočňovaný celý rad výskumov ako zmeniť a zvýšiť imunologickú odpoveď na infekciu uvedeným mikroorganizmom. U ľudí s týmto ochorením bol zistený vysoký titer protilátok proti *B. burgdorferi*, táto skutočnosť však nebola žiadnym ukazovateľom ochrany proti infekcii. Je pravdepodobné, že pôvodca infekcie prechádza veľmi rýchlo z krvných ciest do tkanív, kde už nie je pre imunologický systém bezprostredne dosiahnuteľný. To znamená, že ochrana protilátkou je možná len bezprostredne po začiatku infekcie, kedy sa mikroorganizmus nachádza ešte v krvných cestách.

Skutočnosť, že prirodzená infekcia *B. burgdorferi* bola zistená u množstva živočíšnych druhov, viedla k pokusom vytvoriť laboratórne modely pre uvedené ochorenie, až doteraz s obmedzeným úspechom. Pri niektorých pokusoch so špecifickou odpoveďou proti *B. burgdorferi* pri myšiach bolo preukázané, že infekcia pri inbredných myších kmeňoch, pestovaných už dlhší čas s izolátom *B. burgdorferi* viedla k miernym, ale významným patomorfologickým zmenám rôznych orgánov, ako je mozog, srdce, pľúca a ľadviny, pričom tieto zmeny boli porovnateľné so zmenami u ľudí s týmto ochorením, ako bolo uvedené v publikácii Schaible a ďalší, /1988/, Infect. Immun. 1, 41. Skutočnosť, že sa vytvorili len mierne zmeny, bola asi spôsobená poklesom schopností vyvolať protilátky a zníženou virulenciou mikroorganizmu, už dlho pestovaného *in vitro* alebo schopnosťami myši vyvinúť dostatočnú imunologickú odpoveď, ako to bolo opísané v publikáciách Johnson a ďalší, /1984/, J. Clin. Microbiol. 20, 747, Schwan a ďalší /1988/, Infect. and Immun. 56, 1837.

Vynález si klade za úlohu pripraviť účinnú očkovaciu látku proti uvedenému ochoreniu. Na tento účel je treba najprv získať vhodný laboratórny model. Bolo navrhnuté použiť kmeň myši bez funkčných T- a B-buniek, tzv. kmeň Scid-myši opísaný v publikácii Bosma a ďalší, /1983/ Nature 10, 52, pretože tieto myši vyvinú po infekcii *B. burgdorferi* vo forme izolátov viacsystemové ochorenie a prevažne polyarthritis a karditis. Na tomto modeli je možné po prvýkrát skúšať účinnosť očkovacích látok proti uvedenému ochoreniu.

Podstata vynálezu

Uvedené ciele sa dosiahli pasívnou očkovacou látkou proti ochoreniu Lyme, ktorej podstatou je, že obsahuje špecifické monoklonálne protilátky proti jednému alebo väčšiemu počtu antigénov, a to proti antigénu 31kD /OspA/ a/alebo 34kD /SpB/ *B. burgdorferi*, hlavne OspA a/alebo

OspB *B. burgdorferi*, kmene B31, ATCC 35210 a/alebo ZS7, DSM 5527. Výhodná je očkovacia látka, ktorá obsahuje protilátku podľa vynálezu z triedy IgG, najmä podtriedy IgG2b alebo IgG1. Použitie protilátok podľa vynálezu pôsobí neočakávane na rozdiel od použitia iných protilátok, napríklad proti povrchovému antigénu 41 kD *B. burgdorferi* /Flagelin/ pri imunodeficientných pokusných zvieratách, výhodne Scid-myšiach, infikovaných životaschopnou patogénnou *B. burgdorferi*, zvlášť kmene ZS7 zbrzdzenie zápalu kĺbov, srdcového svalu a pečene a to úplne alebo v značnej miere.

Protilátka podľa vynálezu môže byť spracovaná na liekovú formu pri použití bežných nosičov, plnív a pomocných látok.

Vynález sa taktiež týka spôsobu výroby pasívnej očkovacej látky proti ochoreniu Lyme z lymfocitov alebo slezinových buniek pokusného zvieratá, výhodne myši po imunizácii *B. burgdorferi* alebo časťami tohto mikroorganizmu, výhodne úplnými mikroorganizmami *B. burgdorferi* B31 a/alebo ZS7, pričom sa z lymfocytov alebo slezinových buniek tohto zvieratá získa fúziou buniek hybridom, produkujúci monoklonálne protilátky podľa vynálezu.

Vynález sa rovnako týka patogénneho kmeňa *B. burgdorferi* ZS7, DSM 5527.

Zvláštnym predmetom vynálezu je antigén z *B. burgdorferi* ZS7, ktorý špecificky reaguje s protilátkou podľa vynálezu, s reťazcom aminokyselín z obr.1 alebo s imunogénnym epitopom tohto reťazca. Vynález sa tiež týka rekombinantnej DNA, ktorá obsahuje.) reťazec v obr. 1, 2. reťazec nukleových kyselín, získaných z tohto reťazca degeneráciou genetického kódu alebo 3. reťazec, získaný z reťazca 1. a/alebo 2. za stringentných hybridizačných podmienok, všetky tieto reťazce sú kódom pre antigén 31 kD z *B. burgdorferi* ZS7 alebo jeho imunogénny epitop. Stringentné hybridizačné podmienky sú vysvetlené v publikácii Maniatis a ďalší, Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1982), Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Obzvlášť výhodný je antigén podľa vynálezu, ktorý je rekombinantnou bielkovinou s β -galaktozidázovým génom, a to s fúziou alebo bez nej.

Vynález sa taktiež týka rekombinantného vektora s obsahom jednej alebo väčšieho počtu kópií rekombinantnej DNA podľa vynálezu. Môže ísť o prokaryotický a/alebo eukaryotický vektor, výhodne prokaryotický vektor. Rekombinantný vektor môže byť uložený v bunke mimo chromozómov, napríklad plazmid, alebo môže byť integrovaný do genómu bunky, napríklad bakteriofág lambda. Výhodne ide o plazmid a najmä o rekombinantný vektor pZS-7/31-2, DSM 5528.

Vynález sa tiež týka spôsobu získavania uvedených antigénov sledovaním génovej banky *B. burgdorferi* pri použití protilátok podľa vynálezu s izoláciou klonov, poskytujúcich pozitívnu imunologickú reakciu s použitou protilátkou.

Pretože antigén podľa vynálezu je možné použiť tiež samotný k aktívnej imunizácii, t. j. k indukcii tvorby protilátok v organizme, týka sa vynález tiež aktívnej očkovacej látky, obsahujúcej ako účinnú zložku uvedený antigén a prípadne bežné nosiče a pomocné látky. Výhodne sa tento antigén získa cestou genetickej technológie.

Bolo možné dokázať, že podanie natívneho alebo rekombinantného OspA normálnym myšiam vyvolá tvorbu protilátok, ktoré po pasívnom prenose na Scid-myši, chránia tieto myši pred ochorením. Obzvlášť bolo dokázané, že rekombinantné OspA, vyvoláva imunologickú odpoveď, porovnateľnú s odpoveďou na natívne OspA, takže je možné túto látku použiť na výrobu vakcíny proti uvedenému ochoreniu u ľudí.

Vynález sa taktiež týka spôsobu výroby pasívnej očkovacej látky tak, že sa pokusné zvieratá, výhodne myši, imunizujú antigénom podľa vynálezu a z týchto zvierat sa potom bežným spôsobom získajú polyklonálne alebo monoklonálne protilátky.

Nakoniec sa vynález týka tiež spôsobu izolácie a rekultivácie patogénnej *B. burgdorferi* tak, že sa z imunodeficientných pokusných zvierat, výhodne myši, dopredu infikovaných týmto mikroorganizmom mikroorganizmy získajú naspäť, pričom ich patogenita je zachovaná. Obzvlášť výhodný je postup, pri ktorom sa patogénny *B. burgdorferi* ZS7, DSM 5527 získava z krvi a/alebo kĺbov infikovaných Scid-myši.

Vynález bude ďalej vysvetlený v príkladoch uskutočnenia na základe priložených výkresov.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obrázku 1 je znázornená DNA a reťazec aminokyselín antigénu 31 kD, OspA z *B. burgdorferi* ZS7.

Na obrázku 2 je znázornená imunologická charakteristika rekombinantnej bielkoviny rZS7/31-2.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Indukcia arthritidy, karditidy a hepatitidy pri Scid-myšiach infekciou kmeňom *B. burgdorferi* ZS7

Infekcia myši *B. burgdorferi*

Dospelé myši kmeňa C.B-17 Scid (homozygot pre Scid-mutáciu) a C.B.-17 sa infikujú podkožnou injekciou 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 alebo 1×10^8 životaschopných alebo usmrtených (UV-svetlo) *B. burgdorferi* do koreňa chvosta.

Izolácia *B. burgdorferi* z kliešťov a myši

Výskumy boli uskutočňované s už dlho pestovaným kmeňom *B. burgdorferi* B31, ATCC 35210 a s čerstvým izolátom ZS7, DSM 5527, ktorý bol izolovaný zo samice kliešťa kmeňa Ixodes ricinus. Všetky kmene *B. burgdorferi* boli pestované v modifikovanom Kellyho prostredí z publikácie Barbour a ďalší, (1983) Switzerland. Curr. Microbiol. 3, 123. Organizmy, izolované zo stredného čreva kliešťov, sterilizované etanolom alebo z krvi infikovaných myši boli spochiatku pestované v Kellyho prostredí s pridaním 8 µg/ml kanamycínu a 230 µg/ml fluoruracilu podľa publikácie Johnson a ďalší, (1984) J. Clin. Microbiol. 1, 81.

Serologické testy

Zistenie špecifických protilátok proti *B. burgdorferi* sa uskutočňuje bežným testom ELISA podľa publikácie Justus a ďalší, /1988/ Wehrmed. Mschr. 32, 263. Štandardná krivka na obsah imunoglobulínu /Ig/ bola získaná prevrstvením vyhĺbenia Ig proti myšiam /riedenie 1 : 500 roztoku séra, Paesel, Frankfurt, SNR/ a titráciou obsahu celkového množstva IgG alebo IgM proti myši /Calbiochem, LaJolla, USA/. Obdobným spôsobom bol meraný celkový obsah IgM a IgG v sére. Koncentrácia týchto špecifických protilátok sa udáva v µg/ml séra, vzťahuje sa na Ig.

Imunofluorescencia a farbenie podľa Gimmsy

50 µl krvi sa napipetuje do skúmaviek hematokritu /Becton a Dickinson, Heidelberg, NSR/ a potom sa odstredí pri 5000 g v odstredivke pre hematokrit

/ECCO, NSR/. Skúmavky sa rozrežú vo fáze medzi sérom a erytrocytmi a 5 µl séra sa nanesie na nosič /Superior, Bad Mergentheim, NSR/. Nosič so vzorkou séra sa suší na vzduchu a potom sa fixuje 100 % etanolom 1 minútu pri -20 °C. Po inkubácii 1 hodinu s králičím hyperimúnnym sérom proti *B. burgdorferi* v riedení 1: 100 pri teplote miestnosti sa nosič päťkrát premyje PBS a potom sa 1 hodinu farbí pri použití kozieho antiséra proti králikom, konjugovaného s FITC /riedenie 1:20, Jackson Lab., West Grove, USA/. Potom sa nosič premyje, uloží do zmesi glycerolu a želatíny /Merck, Darmstadt, NSR/ a okamžite sa sleduje vo fluorescenčnom mikroskope. Neošetrené kvapky krvi sa usušia na vzduchu, fixujú v metanole, farbja sa podľa Giemsa /0,1 %, Merck, Darmstadt, NSR/, odfarbja v PBS a uložia do prostriedku Entellan /Merck, Darmstadt, NSR/.

Histologické preparáty a postupy pri farbení

Rôzne vnútorné orgány, ako mozog, srdce, pľúca, pečeň, ľadviny, slezina a kĺby myši, infikovaných *B. burgdorferi* sa v rôznom čase po infekcii odstránia a uchovávajú buď v kvapalnom dusíku na prípravu zmrazených rezov, alebo v 5 % formaldehyde v PBS na uloženie do parafrínu alebo metakrylátu.

Potom sa vytvárajú rezy s hrúbkou 4 až 7 µm, ktoré sa farbja Hematoxylinom-Fosin a potom sa ukladajú do prostriedku Entellan /Merck AG, Darmstadt, NSR/. Imunohistologické sledovanie sa uskutočňuje pri použití systému s obsahom streptavidínu, biotínu a peroxidázy podľa publikácie Kramer a ďalší, /1989/ Eur. J. Immunol. 19,151. Nasledujúca tabuľka 1 ukazuje, že organizmy *B. burgdorferi*, izoláty ZS7a B31 bolo možné zistiť v krvi Scid-myši, naočkovaných životaschopnými mikroorganizmami, po celý čas pokusu. Inak bolo možné rekultivovať len spirochety kmeňa ZS7, ale nie kmeňa B31 in vitro. Pri porovnaní rekultivovaných organizmov s primárnym izolátom ZS7 nebolo možné preukázať žiadne zmeny v obsahu bielkovín alebo v profile plazmidu. Po celý čas pozorovania bolo možné pri Scid-myšiach, infikovaných *B. burgdorferi* preukázať len veľmi malý alebo žiadny titer irelevantných protilátok. Nebolo možné dokázať žiadne protilátky typu IgM alebo IgG, špecifické proti uvedenému mikroorganizmu. Naproti tomu dochádzalo pri kontrolných myšiach C.B.-17, rovnako infikovaných, k expresii veľkého množstva celkových protilátok Ig a súčasne bolo možné dokázať vysoký titer špecifických protilátok IgM a IgG proti *B. burgdorferi*. Medzi 7. a 22. dňom po infekcii izolátom ZS7 bolo možné pozorovať pri Scid-myšiach prvé klinické príznaky zápalu kĺbov, a to sčervenanie a opuch oboch tibiotarálnych kĺbov, stav sa zhoršoval. Nebolo však možné pozorovať žiadne také príznaky pri Scid-myšiach, infikovaných izolátom ZS7 po jeho ožiarení UV-svetlom alebo izolátom B31, a to životaschopným, ani pri kontrolných myšiach C.B.-17, infikovaných životaschopným izolátom ZS7.

Tiež histopatologicky bolo možné dokázať kĺbové zmeny pri Scid-myšiach, infikovaných životaschopným izolátom ZS7, ako je zrejme z tabuľky 1. Bolo možné dokázať ťažké poškodenie kĺbov, ktoré sa prejavovalo zápalovou hyperplasiou synoviálnej výstelky, spojené s rozrušením chrupavky a/alebo kosti. Ďalej bol zistený zápal celého srdca a prienikom mononukleárných buniek do endokardu, myokardu a perikardu. Ďalej bolo možné pozorovať progresívny zápal pečene, pričom bolo možné pozorovať vznik pečenej fibrózy, infiltrácia mononukleárných buniek bola obmedzená na oblasť portálnej žily a veľkých žil. Mimo toho bolo možné pozorovať menšie poškodenie hlavy, pľúc, mozgu a priečne pruhovalých svalov.

Tabuľka 1

Myši	<i>B. burgdorferi</i>		Dni po infekcii	<i>B. burgdorferi</i>		Artridída		Protilátky µg/ml ⁰⁰			
	Kmeň	Počet		Detekcia v krvi ^x	Izolácia ^{xx}	Klinický	histopatologický	Celkom Ig		Špecifické Ig	
								µ	γ	µ	γ
C.B-17 Scid (n=1)	ZS7	5x10 ⁵	7	+	-	-	-	-	20	-	-
			36	+	+B	+	+	-	21	-	-
			49	+	+B	+	+	-	26	-	-
			59	+	+B	+	+	-	396	-	-
	ZS7	1x10 ⁸	7	+	-	+	+	-	108	-	-
			23	+	+B	+	+	-	54	-	-
	ZS7	1x10 ⁸	22	+	-	+	+	-	41	-	-
			29	+	+G	+	+	-	-	-	-
			87	+	+B/G	+	+	-	-	-	-
	ZS7	1x10 ⁵	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
1x10 ⁶		-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
1x10 ⁸		16	+	+	+	+	-	-	-	-	
ZS7uv _{tr}	1x10 ⁸	16	-	-	-	-	-	-	-	-	
B31	1x10 ⁸	22	+	-	-	-	26	37	-	-	
		29	+	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	22	-	-	-	-	47	-	-	
-	-	-	29	-	-	-	-	54	364	-	-
C.B-17 (n=7)	ZS7	1x10 ⁸	16	-	-	-	-	2,515	5,963	438	56
			24	-	-	-	-	2,145	6,374	506	94
	-	-	-	-	-	-	304	3,804	-	-	
	-	-	-	-	-	-	216	1,952	-	-	

x: Giemsove farbenie alebo imunofluorescencia, xx: izolácia z krvi /B/ alebo kĺbov /G/

°: + znamená sčervenanie a opuch tibiotarsálnych kĺbov, 00: - znamená menej ako 7,5 µg/ml séra

n.b.: nebolo prevedené

Príklad 2

Účinnosť špecifickej monoklonálnej protilátky proti antigénu *B. burgdorferi* 31kDa na priebeh Borreliózy-Lyme pri Scid-myšiach

Získanie monoklonálnej protilátky

Pri imunizácii myši s neporušeným imunologickým systémom dochádza pri infekcii *B. burgdorferi* k expresii polyklonálnych protilátok, špecifických pre *B. burgdorferi*, ako je zrejme z tabuľky 1.

Myšie samice inbredného kmeňa BALB/c vo veku 10 týždňov boli imunizované *B. burgdorferi*, kmeňom B31, ATCC 35 210, kmeň bol homogenizovaný ultrazvukom. Imunizácia bola uskutočňovaná nasledujúcim spôsobom:

Deň 0: 200 µg antigénu Borrelia v úplnom Freundovom pomocnom prostriedku podkožne.

Deň 21, 35, 49, 63: ďalších 100 µg antigénu intraperitoneálne vo fyziologickom roztoku chloridu sodného, ktorý obsahuje fosfátový tlmivý roztok.

Deň 66: vybratie sleziny a získanie suspenzie jednotlivých buniek.

Imúnne slezinné bunky boli podrobené fúzii s myelómovou bunkovou líniou Ag8-PA1 štandardným spôsobom pri použití polyetylenglykolu podľa publikácie J. H. Peters, H. Baumgarten, M. Schulze, Monoklonale Antikörper, Springer-Verlag, Heidelberg.

Produkty fúzie boli naočkované do dosiek s 96 vyhábeniami. Po ôsmich dňoch boli supernatanty kultúry sledované skúškou ELISA v pevnej fáze na prítomnosť špecifických monoklonálnych protilátok proti *B. burgdorferi* podľa zvrchu uvedenej publikácie J. H. Peters a ďalších.

Bunky hybridomou z kultúr, produkujúcich protilátky boli po zriedení ďalej klonované. Supernatanty kultúr jednotlivých klonov boli znovu vyšetrené skúškou ELISA v pevnej fáze, analýzou Western-Blot a imunofluorescenciou. Monoklonálne protilátky LA-2 podtriedy IgG2b boli produkované

vané monoklonálnou líniou hybridomou a touto líniou rovnako vylučované a reagovali pri skúške Western-Blot so štruktúrou 31kDa /Osp-A/ všetkých vyšetovaných kmeňov *B. burgdorferi*, mimo iného tiež izoláty ZS7 a B31. Tieto protilátky boli delené elektroforeticky na SDS-géli a tiež skúškou Western-blot pomocou bielkoviny *B. burgdorferi* prenesenej na membránu. Monoklonálne protilátky LA-26.1C /anti-OspA IgG1/, LA 25.1 /anti-OspB, 34 kDa antigén, IgG2b/ a LA 27.1 /anti OspB, 34 kDa antigén, IgG1/ je možné získať a charakterizovať analogickým spôsobom.

Infekcia myši *B. burgdorferi* ZS7

Scid-myši C.B.-17 boli infikované podkožne v oblasti koreňa chvosta množstvom 1 x 10⁸ životaschopných jedincov izolátu *B. burgdorferi* ZS7.

Ošetrovanie myši antisérom

Infikované Scid-myši boli ošetrované 2x týždenne rôznymi antisérmi. Prvej skupine bolo podané sérum NMS /normálne myšie sérum/, druhej skupine sérum IMS /imúnne myšie sérum/ a tretej skupine bolo podané sérum s obsahom monoklonálnej protilátky LA-2 proti antigénu 31kDa *B. burgdorferi*. Dávka antiséra bola v prvom týždni 100 µl alebo 100 µg pre LA-2, v druhom týždni 200 µl alebo 200 µg pre LA-2 a v treťom týždni 300 µg alebo 300 µl pre LA-2.

Z nasledujúcej tabuľky 2 je zrejme, že myši Scid, neošetrené alebo ošetrované NMS mali po 12 dňoch klinické a histopatologické prejavy zápalu kĺbov, srdca a pečene. Oproti tomu monoklonálna protilátka LA-2 podstatne obmedzila tieto príznaky. Klinicky došlo len k ľahkému sčerveneniu a histopatologicky len k marginálnym zmenám. Pri podaní IMS nebolo možné pozorovať žiadne klinické prejavy.

Dôkaz *B. burgdorferi* kultiváciou in vitro bolo možné získať len pri neošetrených myšiach alebo myšiach, ošetrovaných NMS, nie však v prípade LA-2 alebo IMS.

Tabuľka 2

Ošetrovanie Scid-myši C.B-17 antisérom po infekcii *B. burgdorferi*

Scid C.b-17	Antisérum	zápal kĺbov po 12 dňoch		kardi- tis/Hepatitis	preuk. <i>B.</i> <i>burgdorferi</i> kultiváciou
		klinicky	histopato- logicky	histopatolo- gicky	
n=3	-	+	+	+	+
n=3	NMS	+	+	+	+
n=2	IMS	-	-	-	-
n=3	LA-2	x	xx	-	-

x ľahké sčervenanie kĺbov
xx len marginálne zmeny

Príklad 3

Klonovanie a expresia antigénu 31kD / OspA / z *B. burgdorferi* ZS7

Príprava DNA

Vysokomolekulárna DNA z kmeňa *B. burgdorferi* ZS7 bola čistená po kultivácii v modifikovanom Kellyho prostredí. Spirochety boli peletované odstredením pri 10000 g a trikrát premyté PBS - tlmivým roztokom. Usušená peleta bola znovu suspendovaná v 10 ml TE s obsahom 10 mmol/l tris a 1 mmol/l EDTA pri pH 4, potom bol na 15 minút pri teplote 30 °C pridaný lysozym v množstve 5 mg/ml, načo bola DNA uvoľnená pridaním 1 ml 20 % SDS. Po pridaní 1,5 ml roztoku NaCl s obsahom 5 mol/l bol roztok extrahovaný rovnakým objemom fenolu a potom chloroformom. DNA potom bola vyzrážaná pridaním dvoch objemov absolútneho etanolu s následnou inkubáciou cez noc pri teplote -20 °C. Po odstredení bol zvyšok rozpustený v 0,5 ml TE, potom bol inkubovaný s DNA-ázou, jednoduchou RNA-ázou A /20 µg/ml/ počas 45 minút pri teplote 55 °C, načo bola na 1 hodinu pri teplote 37 °C pridaná proteínáza K v množstve 0,1 µg/ml. Potom bol pridaný NaOAc do koncentrácie 0,3 mol/l a zmes bola ako zvrchu extrahovaná fenolom a chloroformom. Po vyzrážaní etanolom bola DNA znovu uvedená do roztoku v TE.

Príprava gémovej banky

Vysokomolekulárna DNA bola štatisticky rozdelená na menšie časti pôsobením ultrazvuku počas 3 sekúnd. Potom bola použitá T4-DNA-polymeráza /30 minút pri 37 °C/ a Klenowov enzým /5 minút pri 20 °C/ k vyrovnaniu zakončenia vzniknutých fragmentov. Vzniknutá DNA bola potom naviazaná do miesta štiepenia enzýmu BamHI vektora na expresiu pUEX1 pri použití stratégie klonovania použitím adaptéru podľa publikácie Bresan and Stanley /1987/ Nucl. Acid. Ees., str. 1056. Po selekcii podľa veľkosti pri použití chromatografie s molekulárnym sítom a prostriedku Sephacryl S-1000 a po transformácii kompetentných buniek *E. coli* MC 1061 bol podiel rekombinantných jednotiek pre tvorbu plakov /pfu/ stanovený nasledujúcim spôsobom. Na zvolené kolónie boli odobraté a pestované v 2 ml selekčného prostredia LB s 25 µg/ml ampicilínu až do nasýtenia. DNA plazmidu bola potom izolovaná bežným rozrušením za alkalických podmienok a potom bola rozštiepená enzýmom BamHI. Viac než 50 % analyzovaného plazmidu obsahovalo včlenené reťazce DNA so stredným priemerom -1,5 kb.

Pestovanie na platniach a skríning gémovej banky *B. burgdorferi* ZS7

Bunky boli nanosené na dosku s rozmerom 24 x 24 cm v množstve 7000 pfu na jednej doske a boli inkubované cez noc pri teplote 30 °C. Po prenose kolónii na nitrocelulóзовý filter /NC/ bola indukovaná expresia zloženej bielkoviny s

obsahom β-galaktosidázy dvojhodinovou inkubáciou pri teplote 42 °C. Filter bol prenesený na papier Whatman 3MM, dopredu spracovaný 5 % SDS a papier bol inkubovaný 25 minút pri teplote 95 °C. Potom boli bielkoviny podrobené elektroblotu pri použití bežného zariadenia k prevedeniu metódy Western blot pri použití čiastočne usušeného materiálu. Po spracovaní NC-filtrov DNA-ázou boli imunoreaktívne klony identifikované s použitím monoklonálnych protilátok. Nešpecifické väzbové miesta na NC-filtroch boli nasýtené štvorhodinovou inkubáciou s PBS s obsahom 0,2 % hmotnostných želatíny a 3 mmol/l Na₃ pri teplote miestnosti. Nakoniec boli filtre inkubované 18 hodín za stáleho pretrepávania so supematantmi kultúry anti-31kD monoklonálneho klonu LA-2. Po dôkladnom premytí /PBS + 1% objemové Tritonu X-100/, potom PBS + 0,5 mol/l chloridu sodného a nakoniec PBS + 1 mol/l chloridu sodného, každý stupeň trvá 10 minút, boli filtre inkubované 1,5 hodín pri teplote miestnosti za stáleho pretrepávania s králičou protilátkou proti myšiemu IgG, poznačenou peroxidázou F/ab₂ v riedení 1: 10 000. Filtre boli znovu premyté ako zvrchu a potom boli inkubované s diaminobenzidínom ako substrátom pre peroxidázu. Z 10⁴ rekombinantných pfu reagovalo 20 klonov s monoklonálnou protilátkou LA-2.

Analýza reťazca antigénu 31kD /OspA/

Bežným spôsobom bola izolovaná včlenená DNA rekombinantného kmeňa *E. coli*, klonu s pozitívnou reakciou s protilátkou LA-2. Včlenená DNA tohto klonu obsahovala gén OspA, ktorý je kódom pre antigén 31kD *B. burgdorferi* v celej jeho dĺžke. Plazmid, ktorý obsahoval tento reťazec, bol označený pZS-7/31-2 a bol označený podľa budapeštianskej zmluvy a bol uložený do verejnej zbierky pod číslom DSM 5528.

Rekombinantná bielkovina, produkovaná týmto pozitívnym klonom bola označená rZS7/31-2 a bol stanovený kódový reťazec DNA génu OspA. Tento reťazec je uvedený na obr. 1 spoločne s odvodeným reťazcom aminokyselín pre bielkovinu OspA.

Z obrázku 1 je taktiež zrejme, že antigén 31 kD z *B. burgdorferi* je bielkovina, ktorá obsahuje 273 aminokyselín.

Príprava nezloženej bielkoviny

A/ Klon, pri ktorom dochádza k expresii imunoreaktívnej bielkoviny rZS7/31-2 bol pestovaný cez noc pri 30 °C v 10 ml prostredia LB s ampicilínom. 1 ml kultúry bol potom pridaný ku 100 ml selekčného prostredia a materiál bol pestovaný pri 30 °C za prevzdušňovania až do hustoty 8 x 10⁷ buniek v 1 ml /A₆₀₀=0,2/. Expresia rekombinantných bielkovín bola dosiahnutá prenesením buniek do teploty 42 °C. Po schladení a odstredení boli bunky premyté tlmivým roztokom STE, ktorý obsahoval 10 mmol/l tris, 100 mmol/l chloridu sodného a 1 mmol/l EDTA pri pH 8,0 a

získaný materiál bol znovu uvedený do suspenzie v 0,6 ml tlmivého roztoku na rozrušenie buniek s obsahom 25 % sacharózy a 50 mmol/l tris pri pH 8,0. Po pridaní 150 µl roztoku s obsahom 10 mg/ml lyzozýmu bola zmes inkubovaná 15 minút v ľade a potom ešte ďalších 15 minút v ľade za prítomnosti 18 µl roztoku s obsahom 10 mg/ml DNA-ázy I za prítomnosti 5 µl 1 mol/l chloridu horečnatého. Potom bolo pridaných 250 µl 4 x zmesi zmáčadiel /1 % Triton X 100, 0,5 % Deoxycholátu, 0,1 mol/l NaCl, 10 mmol/l tris, s pH 7,4/ a zmes bola znovu inkubovaná 5 minút v ľade. Po odstredení bola usadenina dvakrát premytá tlmivým roztokom A /50 mmol/l tris, 50 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA s pH 8,0/ a potom bol materiál znovu uvedený do suspenzie v deviatich objemoch tlmivého roztoku A s obsahom 8 M močoviny a zmes bola 1 hodinu inkubovaná pri teplote miestnosti. Potom bola vzorka zriedená deviatimi dielmi tlmivého roztoku B /50 mmol/l dihydrogenfosforečnanu a hydrogenfosforečnanu draselného, 50 mol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA s pH 10,7/, zmes sa ešte 30 minút mieša pri teplote miestnosti a pH sa udržiava hydroxidom draselným na hodnote 10,7. Potom sa pH roztoku upraví na 7,0 pridaním kyseliny chlorovodíkovej a vzorka sa dialyzuje cez noc proti tlmivému roztoku A pri teplote 4 °C, potom 10 minút pri teplote 4 °C, načo sa odstreďuje 10 minút pri teplote 4 °C a 10 000 ot./min. /rotor SS34/. Supernatant s obsahom rekombinantnej bielkoviny sa uchováva pri -20 °C.

B/ Vzhľadom na to, že tento klon vylučuje imunoreaktívnu bielkovinu rZS7/31-2 tiež do živného prostredia, je možné čistenie afinitnej chromatografie priamo zo supernatantu kultúry.

Príprava rekombinantnej nezloženej bielkoviny OspA a čistenie afinitnej chromatografie.

Rekombinantné bielkoviny potom boli čistené afinitnou chromatografiou. Na tento účel boli na aktivovanú Sepharose CL 4B kovalentne viazané čistené monoklonálne protilátky LA-2. Dialyzovaný extrakt močoviny bol s rekombinantnou bielkovinou naviazaný na Sepharose CL 4B s myším IgG a nakoniec bola táto zmes pridaná do stĺpca LA-2-Sepharosy CL 4B. Po intenzívnom premytí bola viazaná rekombinantná bielkovina podrobená elúcii zmesí 0,1 mol/l glycinhydrochloridu a 0,1 mol/l NaCl s pH 2,5. Potom bolo pH tejto frakcie neutralizované okamžitým pridaním 1/10 objemu 0,5 mol/l K_2HPO_4 . Frakcie s obsahom bielkoviny boli koncentrované a dialyzované. Pomocou elektroforézy na SDS-polyakrylamínovom géli bol stanovený stupeň čistoty.

Imunologická charakteristika rekombinantnej bielkoviny rZS7/31-2

Rekombinantná bielkovina rZS7/31-2 bola imunologicky skúmaná. Na porovnanie bola použitá rekombinantná bielkovina rB31/41-9 /povrchový antigén 41 kD *B. burgdorferi*.

Mikrotitračné platne s plochým dnom boli prevrstvené extraktom rekombinantnej bielkoviny rZS7/31-2 a rB31/41-9 s použitím extraktu z močoviny, prípadne extraktom kmeňa *E. coli* MC 1061, ktorý bol použitý k expresii génu. Nešpecifické väzbové miesta boli blokované 0,2 % želatínou v roztoku chloridu sodného s obsahom fosfátového tlmivého roztoku. Do vyhlbenia takto pripravených mikrotitračných platní boli pridané monoklonálne protilátky LA-2 /anti-31 kD, Osp-A/, La-1 /anti-41 kD, Flagellin/ a ACHT-2 /anti- α_1 -Antichymotrypsin/.

Viazané monoklonálne protilátky boli uvedené do reakcie s imunoglobulínmi, špecifickými proti myšiam a ozna-

čenými peroxidázou. Viazané protilátky, označené peroxidázou boli kvantitatívne stanovené pomocou orthofenylen-diaminy ako substráty na peroxidázu. Absorpcia pri 492 nm / A_{492} / bola stanovená priamo na mikrotitračnej platni pomocou automatizovaného fotometra. Veľkosť absorpcie je priamo úmerná množstvu viazanej monoklonálnej protilátky. Monoklonálna protilátka LA-2 špecificky reaguje s bielkovinou rZS7/31-2, ale nie s MC 1061 alebo rB31/41-9. Kontrolná reakcia monoklonálnej protilátky LA-1 je špecifická pre rB31/41-9. Monoklonálna kontrolná protilátka ACHT-2 /negatívna kontrola/ sa neviaže na žiadnu z uvedených bielkovín.

Na obr. 2 je znázornené, že dochádza k expresii antigénneho epitopu na rekombinantné bielkoviny rZS7/31-2 po klonovaní z genómu *B. burgdorferi* ZS7, pričom tento antigénny epitop je špecificky rozpoznávaný monoklonálnou protilátkou LA-2.

Príklad 4

Porovnanie špecifických protilátok proti antigénu 31 kD /OspA/ a 34 kD /OspB/ s protilátkami, ktoré sú špecifické pre antigén 41 kD /Elagellin/

Monoklonálne protilátky LA-2 a LA-26.1 rozpoznávajú antigén 31 kD OspA a je možné ich priradiť k isotypu IgG2b a IgG1. Monoklonálne protilátky LA-25.1 a LA-27.1 rozpoznávajú antigén 34 kD OspB a je možné ich priradiť k isotypu IgG2b a IgG1. Monoklonálne protilátky LA-10 a LA-21 sú špecifické pre periaplazmatickú bielkovinu 41 kD, spojenú s bičkami *B. burgdorferi* a je možné ich priradiť k isotypu IgG2a a IgG1. Všetky zvrchu uvedené protilátky je možné získavať spôsobom podľa príkladu 2. Malo by byť stanovené, či tiež monoklonálne protilátky proti inému antigénu *B. burgdorferi* poskytujú Scid-myšiam ochranu pred klinickými prejavmi infekcie.

Polyklonálne imúnne sérum anti-B31-IMS/ bolo odoberaté z myši C57BL/6 91 dní po podkožnom podaní 1×10^8 organizmov *B. burgdorferi* B31. Polyklonálna anti-ZS7 IMS bola odoberatá z myši C57BL/6 po 68 dňoch po podkožnom naočkovaní 1×10^8 organizmov *B. burgdorferi* ZS7. Obe séra obsahovali 60 µg/ml špecifických protilátok, ako bolo možné dokázať skúškou ELISA podľa publikácie Schaible a ďalší, J. Exp. Med. 170 /1989/, 1427-1432. Normálne myšie sérum /NMS/ bolo odoberaté z neinfikovaných myši C57BL/6.

Od naočkovania v intervaloch štyri dni boli zvrchu uvedené protilátky alebo PBS tlmivý roztok podávané pasívne intraperitonálne Scid-myšiam nasledujúcim spôsobom:

deň 0 a 3: 100 µl,
deň 7 a 10: 200 µl,
deň 13 a 17: 300 µl.

Scid-myši, ošetrované protilátkami anti-ZS7 IMS, anti-B31 IMS alebo monoklonálnou protilátkou LA-2 nemali žiadne viditeľné klinické príznaky zápalu kĺbov, nedošlo ku sčervreniu ani opuchu tibiotarzálnych kĺbov v priebehu 21 dní. Neobjavili sa ani príznaky zápalu srdca a pečene. Histopatologické vyšetrenie nedokázalo zmenu kĺbov, srdca a pečene pri Scid-myšiach, ktoré dostali ktorúkoľvek z týchto protilátok.

Tiež ďalšie OspA špecifické monoklonálne protilátky LA-26.1 /IgG1/ a OspB špecifické protilátky LA-25.1 a LA-27.1 potlačovali alebo zmierňovali všetky príznaky, tu však došlo k ľahkým patologickým zmenám uvedených orgánov.

Naproti tomu mali Scid-myši po podaní tlmivého roztoku PBS, NMS alebo monoklonálnej protilátky proti Flagellinu /LA-10 alebo LA-21/ klinické príznaky typickej ar-

trítidy, ako je zrejmé pri neošetrených myšiach a ako je uvedené v tabuľke 3. Ťažké príznaky sa zvyšovali v priebehu času po naočkovaní a po celý čas pozorovania sa nezmiernili. Zo Scid-myší, dopredu ošetrených anti-ZS7 IMS alebo LA-2 nebolo možné izolovať spirochety. Naproti tomu bolo

možné dokázať spirochety imunofluorescenciou a kultiváciou z krvi tých Scid-myší, ktoré boli ošetrené podaním tlmivého roztoku PBS, NMS alebo monoklonálnymi protilátkami LA-25.1, LA-26.1, LA-27.1, LA-10 alebo LA-21.

Tabuľka 3

Scid-C.B-17 počet myší	ošetrenie	subtyp IgG	Klinická artritída	Histopatologická periartritída/artritída	carditis	preukáz. <i>B. burgdorferi</i> kultivácia a imunofluorescencia
n = 8	PSB (neg. kontrola)		+	+	+	+
n = 3	NMS(neg. kontrola)		+	+	+	+
n = 3	anti-B31 IMS		-	-	- ^x	+ ⁰
n = +	anti ZS7 IMS		-	-	- ^x	-
n = 6	LA-2 (OspA)	2b	-	- ^x	- ^x	-
n = 3	LA-10 (Flagellin)	2a	+	+	+	+ ⁰
n = 3	LA-21 (Flagellin)	1	+	+	+/-	+
n = 3	LA-26.1 (OspA)	1	±	±	±	+ ⁰
n = 3	LA-25.1 (OspB)	2b	±	±	±	+
n = 3	LA-27.1 (OspB)	1	±	±	±	+ ⁰

Stupeň patologických zmien je označovaný takto: - žiadny, --^x subklinický,

+/- mierny, + ťažký

⁰ = dôkaz *B. burgdorferi* imunofluorescenciou nebol možný u všetkých jedincov

Príklad 5

Vplyv antiséra myší, imunizovaných OspA na priebeh ochorenia pri Scid-myšiach

V tomto pokuse bolo dokázané, že podanie natívneho OspA, izolovaného z *B. burgdorferi* ZS-7 alebo rekombinantného OspA, izolovaného z baktérie *E. coli*, transformovaných rekombinantným plazmidom pZS-7/31-2, DSM 5528 vyvoláva pri normálnych myšiach kmeňa C57BL/6 tvorbu ochranných polyklonálnych protilátok. V prípade, že tieto protilátky sú podané Scid-myšiam, chránia pred ochorením. Bolo teda možné dokázať, že rekombinantné OspA vyvoláva ochrannú imunologickú odpoveď, porovnateľnú s odpoveďou na natívne OspA. Výsledky a podrobnosti pokusu sú uvedené v tabuľke 4.

Získanie rekombinantného OspA je uvedené v príklade 3

Získanie natívneho OspA a imunizácia myší týmto materiálom bude ďalej opísaná.

Získanie natívneho 31 kD a OspA

$3,2 \times 10^{10}$ spirochet sa mieša 2 hodiny pri 4 °C v 5 ml PBS/7,5 ml n-butanolu za prítomnosti inhibítora proteázy /5 mmol/l EDTA, 5 mmol/l benzamidinu a 0,5 mmol/l PMSF/ pri použití magnetického miešadla. Potom sa zmes odstreďuje 90 minút s 10 000 ot/min. a 4 °C v odstredivke /Sorvall/. Vodná fáza s obsahom povrchovej bielkoviny sa izoluje a trikrát premyje chloroformom. Obsah bielkoviny sa zistí extinkciou pri 280 nm alebo testom BCA.

V géli s obsahom striebra alebo metódou Westernblot s králičím sérom proti *B. burgdorferi* je možné dokázať pre kmeň ZS7 hlavný pás s molekulovou hmotnosťou 31 kJ a slabšie pásy pri 20, 34 a 65 až 68 kJ. V zmesi butanolu a vody poskytuje kmeň B31 hlavný pás pri 31 kJ a slabšie pásy 20 a 34 kJ.

Imunizácia myší natívnym a rekombinantným OspA

Myši C57BL6 a myši C.B-17 boli očkované trikrát v odstupe 7 až 10 dní podaním 5 µg natívneho OspA kmeňa B31 alebo 10 mg natívneho OspA kmeňa ZS7, alebo rekombinantného OspA toho istého kmeňa v 100 µl pomocného prostriedku / ABM3, Fa. Sebak, Ainenbach, NSR/

podkožne v oblasti koreňa chvosta. Najskôr 3 týždne po poslednom podaní bolo možné odoberať sérum 3 až 4 mesiace. Obsah špecifických protilátok bol stanovený metódou ELISA.

Tabuľka 4

Vplyv špecifických monoklonálnych a polyklonálnych protilátok proti *B. burgdorferi* na spirochetosu a vývoj zápalu kĺbov pri infikovaných Scid-myšiach

Scid-myši C.B.-17 počet	ošetrenie	vývoj zápalu kĺbov týždne			dôkaz <i>B. burgdorferi</i>
		1	2	3	
n = 6	PBS (negat. kontrola)	±	+	+	6/6
n = 6	LA-2	-	-	-	0/3
n = 2	anti OspA (natívna) IMS	-	-	-	0/2
n = 3	anti OspA (rekomb) IMS	-	-	-	0/3

Prvá dávka protilátky bola podaná intraperitoneálne v objeme 100 µl v dni 0, t. j. súčasne s infekciou *B. burgdorferi* ZS-7, 1×10^8 organizmov podkožne do oblasti koreňa chvosta. Ďalšie dávky protilátok boli podané v dňoch 4 /100 µl/, 7 /200 µl/, 11 /200 µl/, 14 /300 µl/, 18 /300 µl/, vždy intraperitoneálne.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Patogénny mikroorganizmus *B. burgdorferi*, kmeň ZS7, DSM 5527.

2. Spôsob izolácie a rekultivácie patogénnych organizmov *B. burgdorferi*, podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú - c i s a t ý m**, že sa z imunodeficientných pokusných zvierat, výhodne myší, dopredu infikovaných infekčným organizmom tento organizmus získa naspäť, pričom jeho patogenita zostáva zachovaná.

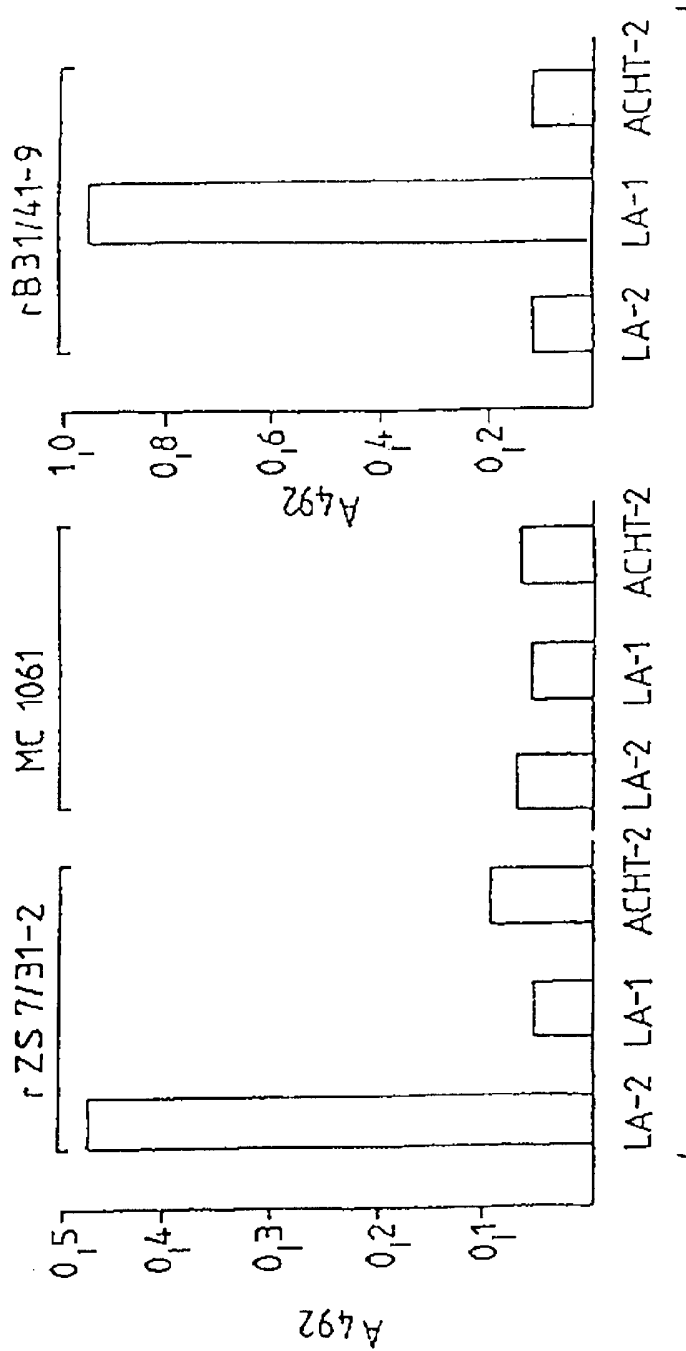
3. Spôsob podľa nároku 2, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa patogénny organizmus *B. burgdorferi* ZS-7 získava z krvi a/alebo kĺbov infikovaných Scid-myši.

2 výkresy

atgaaaaaatattttattgggaataggctcaatattagccttaatagcatgtaagcaaaat
M K K Y L L G I G L I L A L I A C K Q N
gttagcagccttgacgagaaaaacagcgtttcagtagatttgccctggfgaatgaacgct
V S S L D E K N S V S V D L P G E M N V
cttctaagcaaaagaaaaaacaagacggcaagracgataatgcaacagtagacaag
L V S K E K N K D C K Y D L I A T W D K
cttgagcctaaaggaactttctgataaaaacaatggatctggagtacttgaaggcgtaaaa
L E L K G T S D K N N G S G V L E G V K
gctgacaaaagtaaaagtaaaattaacaatttctgacgatactaggtcaaacacacttgaa
A D K S K V K L T I S D D L G O T T L Z
gttttcaaggaagatggcaaacactagatcaaaaaagtaacttccaagacaagtca
V F Y E D G K T L V S K X Y T S K D K S
tcaecagaagaaaaattcaatgaaaaggtgagatctgaaaaataataacaagagca
S T E E K F N E K G E V S E K I I T R A
gacggaaccagacttgaatacacagaattataagcgatggatctggaagctaaagca
D G T R L E Y T E I K S D G S G K A K E
gttttaaaaagctatgctctctgaaggaacttcaactgctgaaaaaacaacattggtggt
V L K S Y V L E G T L T A E K T T L V V
aaagaaggaactgctactttaagcaaaatatttcaaatctggggaagttcagctgaa
K Z G T V T L S K N I S K S G E V S V E
cttaatgacectgacagtagtgctgctactaaaaaaactgcagcttggatcaggcact
L N D T D S S A A T K K T A A W N S G T
tcaactttaacaattactgtaaacagtaaaaaactaaagaccttgtgtttacaaaagaa
S T L T I T V N S K K T K D L V F T K E
zacaattacagtagacaacaatagactcaaatggcaccacaattagaggggtcagcagtt
N T I T V Q Q Y D S N G T K L E G S A V
gaattacaaaacttgatgaaattaaaaacgctttaaaataa
E I T K L D E I K N A L K -

Obr. 1

Obalové bielkoviny



Monoklonálne protilátky

Obr. 2

Koniec dokumentu