

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Mgr. Vlastimil Král

REKOMBINANTNÍ FRAGMENTY PROTI LÁTEK

Doktorská práce

Školitel: Ing. Juraj Sedláček, DrSc.

Ústav molekulární genetiky, Akademie věd České republiky, v.v.i.



Praha 2008

Rád bych poděkoval Jurajovi Sedláčkovi z Laboratoře strukturní biologie na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i, vedoucímu skupiny a školiteli, za vytvoření výborných pracovních podmínek a za zadání tématu doktorské práce. Milanovi Fábrymu, svému průvodci doktorským studiem, děkuji za laskavé vedení práce a zejména za uvedení do technik molekulární biologie, proteinového inženýrství a cenné rady získané dlouholetou praxí.

Děkuji Vladimíru Tomáškoví, Jiřímu Bryndovi a Ireně Sieglové za mnoho neocenitelných rad ohledně purifikace rekombinantních proteinů. Magdě Hořejší děkuji za rady v začátcích práce s protilátkami. Pavlíně Řezáčové děkuji za podporu a rady při mých pokusech s krystalizací scFv fragmentů a za inspirující disertační práci. Dále bych chtěl poděkovat svému souputníku, Pavlu Maderovi, za poskytnutí antigenu pro jednu z studovaných protilátek a za pocit, že v tom nejedu sám. Můj dík patří našim laborantkám (Věře Mrkvičkové, Jitce Kredbové a Jitce Káralové) za ochotnou pomoc a všem ostatním kolegům z Laboratoře strukturní biologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí a všestrannou pomoc.

V posledním odstavci bych rád poděkoval své rodině, která mě podporovala po celou dobu mých studií a bez jejíchž pomoci a podpory bych stěží vystudoval a tato práce určitě nevznikla.

1	Úvod	1
2	Teoretický úvod	2
2.1	Protilátky	2
2.1.1	Struktura imunoglobulinů	6
2.1.2	Povaha interakcí antigen-protilátka	11
2.2	Terapeutické protilátky	13
2.3	Rekombinantní fragmenty protilátek	14
2.3.1	Přístupy k produkci rekombinantních fragmentů protilátek	18
2.3.2	Afinitní maturace / <i>in vitro</i> evoluce	20
2.3.3	Metody humanizace rekombinantních protilátek	22
2.4	Farmaceutické využití protilátek a jejich fragmentů	26
2.4.1	Návrh farmakologicky zajímavých látek, odvozených z protilátek	27
2.4.2	Klinicky používané a v závěrečných zkouškách testované protilátky a jejich fragmenty	28
3	Cíle disertační práce	32
4	Metody a materiály	33
4.1	Buňky, vektory, média	33
4.2	Metody	34
4.2.1	Molekulární klonování - konstrukce scFv fragmentů	34
4.2.1.1	Izolace celkové RNA	34
4.2.1.2	Příprava cDNA	34
4.2.1.3	Amplifikace variabilních úseků	35
4.2.1.4	Sestavení scFv molekul	36
4.2.1.5	Úprava scFv modulu pro purifikaci produktu na IMAC nosiči	37
4.2.1.6	Konstrukce scFv pro expresi do periplasmy	38
4.2.1.7	Konstrukce scFv modulu pro H-L orientaci variabilních domén	38
4.2.1.8	Konstrukce scFv se zkráceným linkerem	40
4.2.1.9	Konstrukce scFv M75 ve formátu L-20-H	41
4.2.1.10	Příprava fragmentu M75 ve formátu intrabody	41
4.2.1.11	Konstrukce „kamelidu“ M75	44
4.2.2	Transformace, transfekce	44
4.2.3	Rekombinantní exprese v <i>Escherichia coli</i>	45
4.2.3.1	Expresce scFv do cytoplasmy, izolace inkluzních tělísek	45
4.2.3.2	Renaturace scFv z cytoplasmatických inkluzí	45
4.2.3.3	Expresce scFv do periplasmy, izolace rozpustného scFv	46
4.2.3.4	Renaturace scFv z periplasmatických inkluzí	47
4.2.4	Rekombinantní exprese scFv v S2 buňkách	48
4.2.5	Příprava Fab fragmentu proteolytickým štěpením	48
4.2.6	Afinitní chromatografie	48
4.2.7	Ionexová chromatografie	49
4.2.8	Gelová filtrace	49
4.2.9	Elektroforéza proteinů	51
4.2.10	Izoelektrická fokusace	52
4.2.11	Western Blot (elektropřenos proteinů na membránu)	52
4.2.12	ELISA	53
4.2.13	ITC & DSC	55

4.2.14	Průtoková fluorescenční cytometrie (FACS-Fluorescent Activated Cell Sorting)	55
4.2.15	Měření fluorescence.....	56
4.2.16	Analýza glykosylace.....	57
5	Výsledky a diskuse	58
5.1	Konstrukce rekombinantních fragmentů protilátek.....	58
5.2	Exprese.....	60
5.3	Renaturace.....	64
5.4	Purifikace.....	66
5.5	Analýza produktů	69
5.6	Vliv délky linkeru na stupeň oligomerizace scFv.....	71
5.7	Specifické výsledky získané u jednotlivých rekombinantních protilátek....	76
5.7.1	Rekombinantní fragmenty odvozené z mAb TU-20.....	76
5.7.1.1	Purifikace	77
5.7.1.2	Stanovení aktivity rekombinantních fragmentů TU-20	80
5.7.1.3	Využití scFv konstruktů TU-20 dalšími partnery	80
5.7.2	Rekombinantní fragmenty odvozené z mAb M75.....	81
5.7.2.1	Purifikace	83
5.7.2.2	Multimery scFv M75	86
5.7.2.3	Testování vlivu teploty na aktivitu rekombinantních fragmentů scFv M75	89
5.7.2.4	ELISA – srovnání aktivity monovalentního Fab fragmentu a scFv fragmentů, vliv orientace domén a pH.....	90
5.7.2.5	Izotermální titrační kalorimetrie (ITC) a Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)	93
5.7.2.6	Testování aktivity scFv M75 na buněčné linii HT29	96
5.7.2.7	Kamelid M75	97
5.7.2.8	Intrabody.....	98
5.7.3	Rekombinantní fragment odvozený z mAb F11.2.32.....	101
5.7.3.1	Renaturace a aktivita scFv fragmentu F11.2.32	102
5.7.4	Rekombinantní fragmenty odvozené z mAb MEM97.....	103
5.7.4.1	Purifikace	105
5.7.4.2	Glykosylace rekombinantního fragmentu scFv MEM97.....	106
5.7.4.3	Testování vazebné aktivity scFv fragmentů MEM97 pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (FACS).....	108
6	Závěr.....	112
7	Seznam použitých zkratk	113
8	Přílohy	116
9	Seznam publikací	118
10	Seznam použité literatury	119

1 Úvod

V současné době se v ekonomicky bohatší části světa rozvíjí léčba pomocí cílených terapeutik. Jedná se především o molekuly intaktních rekombinantních protilátek (např. Rituximab), kterých je momentálně na trhu okolo dvaceti a v klinických studiích je mnoho dalších, včetně rekombinantních fragmentů protilátek (zatím hlavně Fab fragmenty). Vzhledem k tomu, že vývoj léčiva od objevu po klinické studie trvá velmi dlouho, dá se předpokládat, že již dnes jsou návrhy léčiv na bázi dalších rekombinantních fragmentů, jako například: diabody, minibody nebo scFv. Každopádně, scFv formát bývá výchozím experimentálním formátem při pokročilém vývoji léčiv.

Základním formátem rekombinantních fragmentů je Fv fragment, který tvoří nejmenší funkční jednotku odvozenou z molekul „klasických“ protilátek, která si stále zachovává svoji vazebnou aktivitu. Tato funkční molekula je složena z variabilní domény lehkého a těžkého řetězce.

V České republice zatím není technologie vedoucí k získávání rekombinantních fragmentů příliš rozšířena a naší snahou je zavést v národním měřítku technologie vedoucí k získání rekombinantních fragmentů protilátek s přihlédnutím k jejich možnému farmaceutickému využití (naše laboratoř je první, která je schopna tyto fragmenty standardně připravovat). Z tohoto důvodu byla kompletní technologie přípravy rekombinantních fragmentů protilátek ověřována na monoklonálních protilátkách, které jsou potenciálně farmaceuticky využitelné (mAb M75, mAb TU-20, mAb MEM97 a F11.2.32).

2 Teoretický úvod

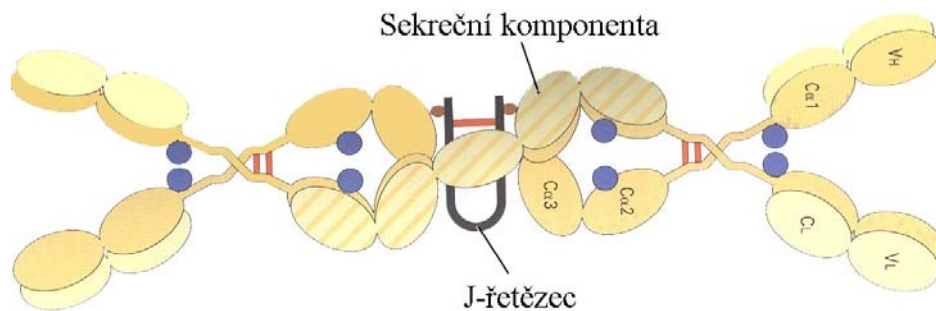
2.1 Protilátky

Protilátky jsou plasmatické glykoproteiny zvané gamaglobuliny. Lidský imunitní systém (B-buňky) je schopen produkovat až 10^9 rozdílných protilátek, které interagují se širokým spektrem antigenů. Zatímco variabilní domény těžkého a lehkého řetězce jsou odpovědné za specifitu k antigenu, konstantní část protilátky odpovídá za její biologickou funkci. C_{H2} doména těžkého řetězce odpovídá za vazbu komplementu a určuje životnost protilátky, C_{H2} a C_{H3} domény jsou odpovědné za vazbu protilátky na Fc receptor fagocytů a stimulují jejich schopnost fagocytosy. Vlastnosti konstantní části protilátky jsou nezávislé na vlastnostech jejich variabilních domén.

Třídy protilátek nesou jména podle svých těžkých řetězců, které značíme α , γ , δ , ϵ a μ . Příslušné izotypy (třídy) imunoglobulinů se pak nazývají IgA, IgG, IgD, IgE a IgM. Ke každému těžkému řetězci přísluší jeden lehký řetězec. Ty jsou pouze dvojího typu (λ nebo κ). Dohromady dávají dva těžké a dva lehké řetězce funkční protilátku. Typický imunoglobulin má 3 až 4 konstantní domény (C_{H1} až C_{H3-4}) a jednu variabilní doménu (V_H) v rámci těžkého řetězce. Lehký řetězec je vždy složen z jedné konstantní (C_L) a jedné variabilní domény (V_L). Výsledné protilátky se liší nejen afinitou k antigenu, ale i místem svého působení či rychlostí produkce po setkání s antigenem. To který izotyp začne plasmatická buňka produkovat závisí do určité míry na cytokinovém působení. K tvorbě IgA přispívá IL-10 a TGF- β (tkáňový růstový faktor β), izotypový přesmyk ve prospěch IgG1 a IgE způsobuje IL-4, IFN- γ (interferon γ) je odpovědný za přesmyk na IgG2 a IgG3.

Imunoglobuliny třídy IgA se vyskytují ve dvou formách, slizniční a sérové. Tyto molekuly jsou ve velkém množství sekretované na povrch sliznic, kde tvoří výraznou část obrany proti mikroorganismům, důležitou funkcí sekretovaného IgA do mateřského mléka je neutralizace patogenů v trávicím traktu novorozenců, než je jejich imunitní systém dostatečně vyzrálý, aby převzal tuto funkci. IgA neaktivuje komplement. Funguje jako opsonin a váže se na specifické Fc α receptory na fagocytech. Slizniční IgA se skládá ze dvou monomerů spojených J-řetězcem a ze se sekreční komponenty (zbytek transportního Fc receptoru; obr. 1), chránící IgA před degradací. Sérový IgA se vyskytuje jako monomer, dimer nebo trimer. Oligomerní formy jsou spojené pomocí J-řetězce (1). Monomer IgA je složen ze dvou těžkých řetězců s třemi konstantními

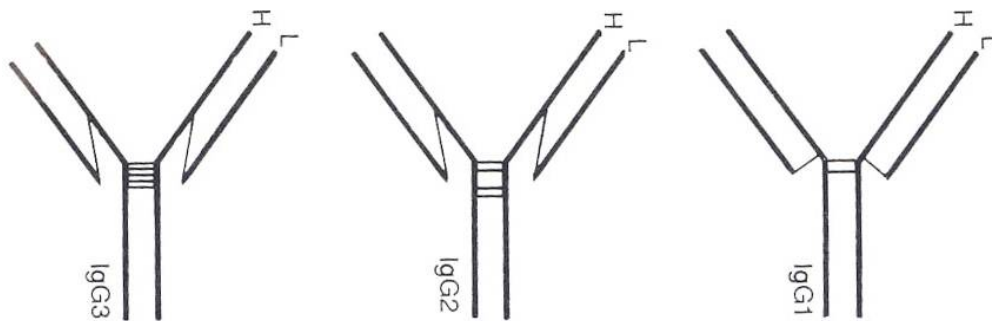
doménami a jednou variabilní a samozřejmě dvou lehkých řetězců a jeho molekulová hmotnost je přibližně 160 000 Da. IgA obsahuje ve své molekule 2 až 3 oligosacharidové řetězce a cca 10 % jejich molekulové hmotnosti připadá na cukernou složku (2). Sekreční IgA má dvě podtřídy, IgA1 převládá v dýchacích cestách, zatímco IgA2 je hlavně v trávicím traktu. IgA1 je produkován převážně slizničními plasmocyty, kdežto IgA2 hlavně v kostní dřeni (1). Biologický poločas je u molekuly IgA1 asi 4,5 dne, kdežto u IgA2 asi 6 dní.



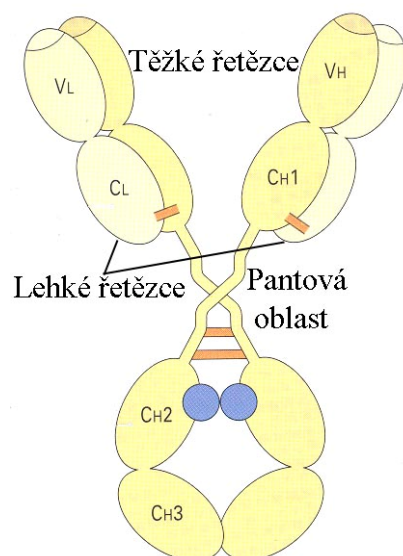
Obrázek 1: Schéma dimerního IgA. Modře jsou naznačena glykosylační místa a červeně disulfidické vazby. Převzato a upraveno z (3).

Rodina imunoglobulinů IgG má čtyři subtypy IgG1 až IgG4. V séru je těchto protilátek ze všech tříd nejvíce, tvoří asi 75 % veškerých imunoglobulinů v séru (2) a jejich koncentrace se pohybuje okolo 13 mg/ml séra (4, 5). Zastoupení jednotlivých tříd je následující IgG1 60-70 %, IgG2 14-20 %, IgG3 4-8 % a IgG4 2-6 %. Tyto hodnoty jsou pouze orientační a záleží od jedince na jejich přesném zastoupení (2). IgG je také jediná molekula mezi protilátkami, která je schopna procházet lidskou placentou (díky receptorům FcRn na buňkách placenty) při těhotenství a je odpovědná za ochranu nově narozeného jedince několik měsíců po narození. Je to také molekula s nejdelším biologickým poločasem asi 22 dní (s výjimkou IgG3, které má poločas asi 7 dní). Jednotlivé subizotypy IgG se také liší v schopnosti vázat komplement: nejlépe jej aktivuje IgG3, následován IgG1 a následně IgG2. IgG4 v podstatě není schopen aktivovat komplement vůbec. Také ve vazbě jednotlivých subizotypů IgG na Fc receptory fagocytů jsou rozdíly. Nejlépe se váží IgG3 a IgG1, IgG4 se váže hůře a nejhůře IgG2. IgG je molekula s nejmenším stupněm glykosylace. Na sacharidovou složku připadá pouze 4% její molekulové hmotnosti a má pouze jeden typ

oligosacharidového řetězce (2). Molekula IgG má dva těžké řetězce s třemi konstantními doménami a jednou variabilní doménou a dva lehké řetězce. Podobně jako u IgA nejsou u různých subtypů IgG rozdílné jen biologické funkce (vazba komplementu atd.), ale liší se i na úrovni struktury jednotlivých subtypů. Jak je patrné z obrázku 2 liší se jednotlivé subtypy polohou a počtem S-S vazeb, které spojují jednotlivé řetězce dohromady. Co se týče těchto vazeb je „rekordmanem“ mezi protilátkami IgG3 které může mít v pantové oblasti až 13 disulfidických vazeb. Molekulová hmotnost kompletní molekuly IgG je okolo 150 000 Da. Některé bakterie (např. některé kmeny stafylokoků) nesou na svém povrchu jakýsi Fc receptor (protein A) pro IgG, a takto se snaží „ošálit“ imunitní systém. Těchto proteinů se dá použít v laboratoři k purifikaci IgG pomocí afinitní chromatografie.



Obrázek 2: Schematické znázornění strukturních rozdílů mezi jednotlivými podtřídami IgG.
Převzato a upraveno z (2).



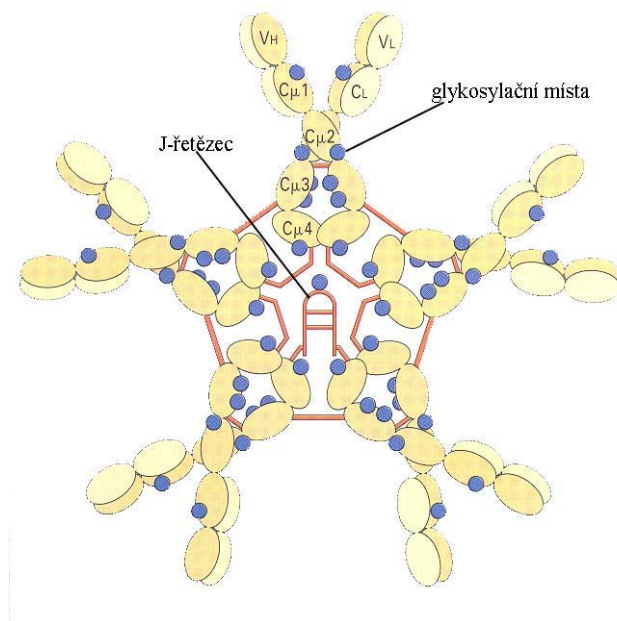
Obrázek 3: Schéma molekuly IgG. Modře je vyznačeno glykosylační místo a červeně inter-řetězcové disulfidické vazby. Převzato a upraveno z (3).

Imunoglobulin IgD zůstává stále záhadou. Tento imunoglobulin se nachází na povrchu většiny B-lymfocytů (podobně jako IgM). Předpokládá se, že se funguje jako aktivační receptor B-lymfocytů (BCR). Jeho přítomnost na povrchu signalizuje, že B-buňka je zralá a připravená opustit kostní dřeň. Velmi malá část IgD je přítomna v séru asi 0,2 % z celkového počtu imunoglobulinů a jeho funkce je zde nejasná. Byla nalezena protilátka velmi podobná IgD u ryb z řádu kostnatých. Zdá se, že IgD je evolučně poměrně stará molekula, která byla přítomná již u obratlovce, který byl předkem savců a ryb (6). Biologický poločas této molekuly je 2-8 dní. Molekulová hmotnost je okolo 180 000 Da a molekula IgD má těžké řetězce tvořeny z jedné variabilní a čtyř konstantních domén a lehké z jedné konstantní a jedné variabilní domény. Sacharidová složka tvoří značnou část IgD, je to asi 18 %. Tento typ imunoglobulinu neaktivuje komplement.

IgE je největší z dosud představených imunoglobulinů (pokud bereme v úvahu jen jejich monomerní formu). Jeho molekulová hmotnost je 190 000 Da. Obsah sacharidů je podobný jako u IgD a tvoří 18% z hmotnosti molekuly. IgE je podobně jako IgD tvořen z těžkých řetězců se čtyřmi konstantními doménami. Mají poměrně krátký biologický poločas, jen 1 až 5 dní. Jeho obsah v séru je ještě nižší než u IgD a to pouze 0,004% z celkového obsahu imunoglobulinů. Uplatňuje se hlavně při obraně proti mnohobuněčným parazitům na sliznicích. Bazofilové a žírné buňky nesou na svém povrchu vysoko-afinní receptory FcεR pro IgE a po jejich aktivaci se tyto buňky degranulují a uvolní do extracelulárního prostoru histamin a další biologicky aktivní mediátory, které nastartují reakce vedoucí k vypuzení parazita z těla (např. zvýšená produkce hlenu či zvýšená propustnost cév). V dnešní době, vzhledem k lepším hygienickým poměrům, dělá ovšem IgE „neplechu“. Je odpovědný za alergické reakce, které někdy mohou skončit anafylaktickým šokem a smrtí. IgE neaktivuje komplement.

Molekula IgM je mezi ostatními imunoglobuliny opravdový obr. V sekretované formě se nachází pouze ve formě pentameru (schéma připomíná pentagon) o molekulové hmotnosti asi 900 000 Da. Pět monomerních jednotek je spojeno do kruhu pomocí cystinových můstků na C_{H3} a C_{H4} a polypeptidového řetězce J (o molekulové hmotnosti asi 70 000 Da). IgM je silně glykosylován, sacharidová složka činí asi 15% z celkové molekulové hmotnosti. Jeho biologický poločas v séru je 5 až 10 dní a tvoří okolo 10% všech imunoglobulinů v séru. Tento imunoglobulin také velmi dobře aktivuje klasickou cestu komplementu. Je také prvním izotypem protilátek, který se začne tvořit po setkání s antigenem, jeho specifita ani afinita však nebývají nijak

velké. Ovšem jeho avidita díky deseti vazebným místům je dostačující. V membránové podobě je součástí BCR receptoru B-lymfocytů a to pouze jako monomer (molekulová hmotnost kolo 190 000 Da). Tyto dvě formy IgM, membránová a sekretovaná, se liší nejen svojí velikostí, ale i aminokyselinovou sekvencí v C-koncové části těžkého řetězce (7). Tato transmembránová část je podobná u všech imunoglobulinů, které tvoří BCR receptor B buněk. Tvoří ji navíc asi 40 aminokyselin. Prvních 12 až 14 aminokyselinových zbytků je silně kyselých a je následováno přibližně 26-ti hydrofobními zbytky (2).



Obrázek 4: Schéma molekuly pentameru IgM. Převzato a upraveno z (3).

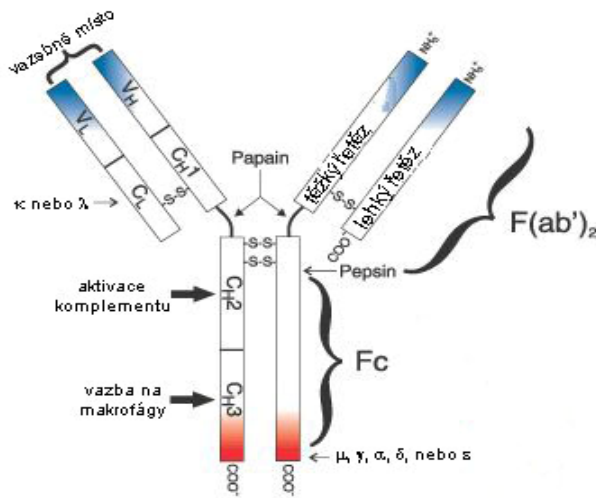
2.1.1 Struktura imunoglobulinů

Typické strukturální rysy sekretovaných protilátek budou popsány na molekule IgG, jelikož má největší zastoupení v séru a také se nejčastěji používá při biotechnologických aplikacích.

Protilátky jsou pravděpodobně momentálně jedny z nejvíce studovaných proteinů, co se týče strukturálních prací. K 21. únoru 2008 bylo v Protein Data Bank k dispozici více než 855 deponovaných trojrozměrných struktur získaných pomocí rentgenové strukturální analýzy a NMR (nukleární magnetická resonance).

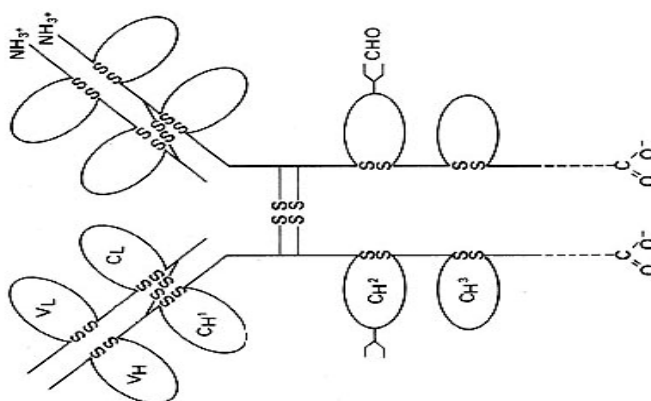
Protilátky jsou glykoproteiny o přibližné velikosti 150 000 Da (pouze monomery) a jsou složeny ze čtyř polypeptidových řetězců: dvou těžkých (H; molekulová hmotnost 50 000 až 75 000 Da podle typu řetězce) a dvou lehkých (L; 25 000 Da). Dva H-řetězce

jsou spojeny dohromady pomocí disulfidových vazeb (počet závisí na izotypu) a ke každému těžkému řetězci je připojen pomocí jednoho cystinového můstku jeden L-řetězec. Výsledný tvar molekuly protilátky má tvar písmene Y (obrázek 5) (8).



Obrázek 5: Schématické znázornění molekuly protilátky. Převzato z (9)

Těžké a lehké řetězce obsahují několik homologních oblastí obsahující podobné, nikoliv však stejné skupiny aminokyselinových sekvencí. Tyto homologní domény se skládají z asi 110 aminokyselin v případě H-řetězců a 50 aminokyselin v případě L-řetězců a tvoří kompaktní globulární struktury charakteristickým způsobem, který se nazývá „immunoglobulin fold“ (10). Každá z domén H a L řetězce se skládá ze stabilního uspořádání antiparalelních β -řetězců, které jsou stabilizovány disulfidovou vazbou (11) (viz obrázek 6).

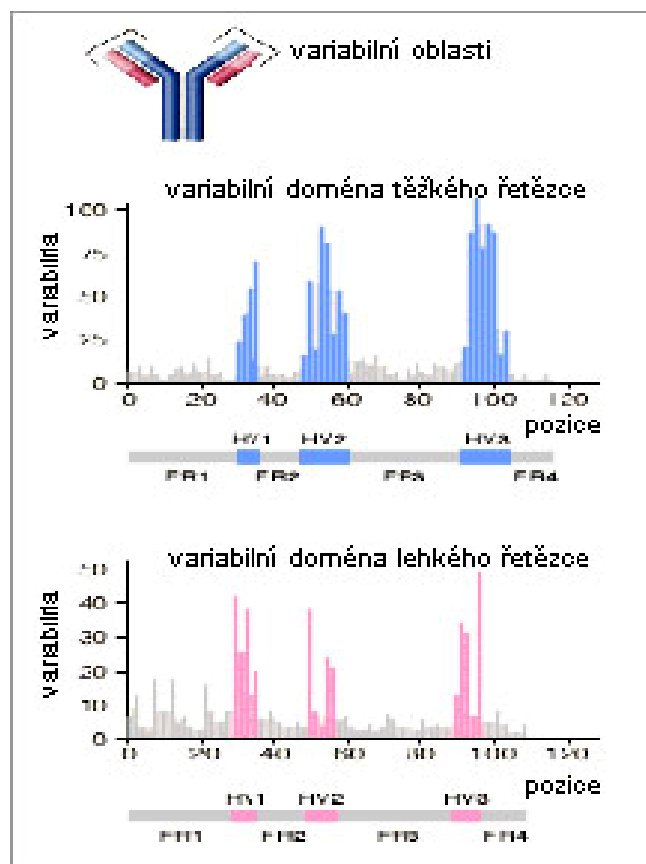


Obrázek 6: Ukázka disulfidických vazeb, inter- i intra-doménových, na příkladu IgG2 molekuly. Převzato a upraveno z (2).

Protilátky mají mezi C_{H1} a C_{H2} doménami oblast, které se říká pantová (z angl. hinge). Tato oblast je odpovědná za flexibilitu Fab ramen protilátky a umožňuje tak

jejich lepší kontakt s antigenem a zároveň jsou v této oblasti umístěny disulfidické vazby spojující těžké řetězce dohromady (viz obrázek 5).

V rámci lehké a těžké variabilní domény jsou oblasti s velmi rozdílným aminokyselinovým složením od tzv. kanonické sekvence (12), tyto oblasti se nazývají hypervariabilní oblasti (HV) a odpovídají za specifitu protilátky k antigenu. Jednotlivé hypervariabilní oblasti (HV 1 až 3) jsou mezi sebou spojeny čtyřmi FR oblastmi (FR z angl. framework), jejichž aminokyselinová sekvence je na rozdíl od HV silně konzervována. (viz obrázek 7).

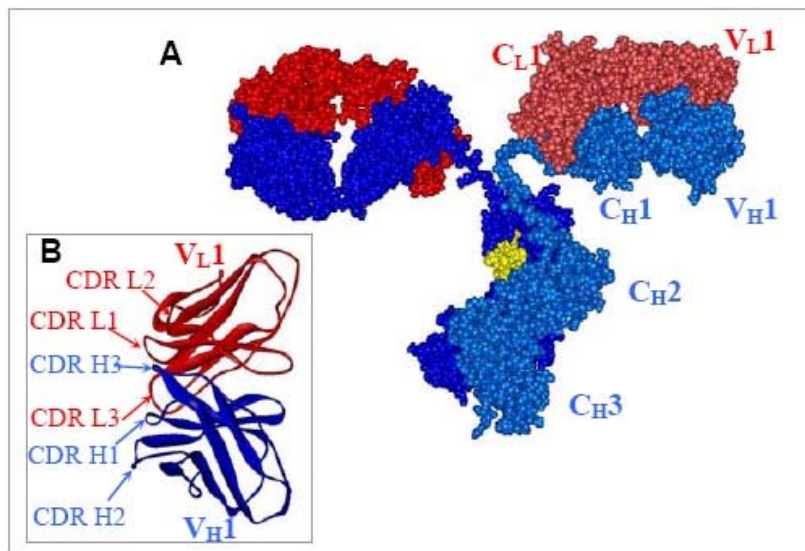


Obrázek 7: Sekvenční variabilita v jednotlivých pozicích variabilních domén těžkého a lehkého řetězce. Převzato a upraveno z (13).

HV oblasti přímo interagují s povrchem antigenu, proto se jím také říká komplementaritu určující oblasti CDR (z angl. Complementarity Determining Regions). V trojrozměrné struktuře jsou CDR oblasti vidět jako smyčky držené pohromadě jakýmsi lešením FR oblastí tvořících strukturu β -listu (viz obrázek 8). Primární úlohou FR oblastí je spojovat jednotlivé CDR oblasti a držet je ve správné pozici (14, 15). Některé aminokyselinové zbytky FR se ovšem mohou přímo účastnit vazby antigenu. Rozsah a konformace každého CDR úseku jsou určeny počtem a vlastnostmi

aminokyselin. Rozdíly v sekvenci a velikosti CDR smyček vyplývají z obrovského počtu antigenních determinant, které jsou protilátky schopny vázat.

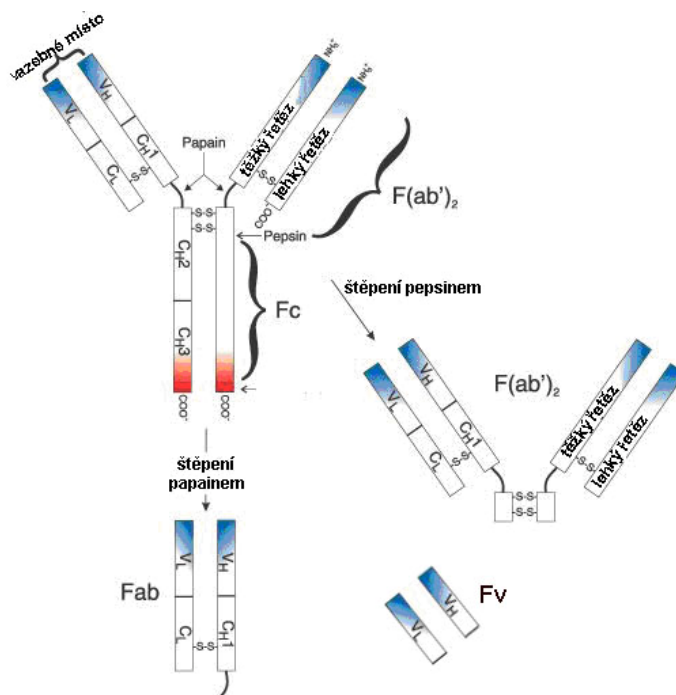
Vztahy mezi aminokyselinovou sekvencí CDR oblastí a jejich strukturou studovali Chothia et al. a Tramontano et al. (15-17). Zjistili, že protilátky mají omezený počet konformací hlavního řetězce známých jako kanonická struktura (16). Do této struktury jsou zahrnuty i relativně proměnné CDR oblasti kromě CDR H3 oblasti, která je příliš variabilní v délce a aminokyselinové sekvenci na to, aby se dala zahrnout do některé formy kanonické struktury (18). Tato CDR H3 oblast má charakteristickou roli při rozpoznávání antigenu a někdy mění svoji konformaci při vazbě antigenu (19). Podle mnohých autorů je právě CDR H3 oblast, která hraje hlavní roli v specifitě dané protilátky k příslušnému antigenu (20-25).



Obrázek 8: Struktura molekuly protilátky. A: Celková struktura první celé protilátky (IgG) popsané v práci Harris et al. (PDB záznam 1IGT) (26). Glykosylace v oblasti těžkého řetězce je značena žlutě. Těžký řetězec je značen modře a lehký červeně. B: Detail variabilních domén tvořících vazebné místo pro antigen s vyznačenými CDR oblastmi. Převzato z (27)

Molekula protilátky se dá rozdělit do několika funkčních celků. Některé fragmenty protilátek mohou být získány působením proteolytických enzymů na molekulu IgG (obrázek 9). Papain rozštěpí molekulu IgG nad interdoménovými cystinovými můstky mezi těžkými řetězci směrem k N-konci. Získáme tak dvě molekuly Fab fragmentu (Fragment, antigen binding), který je tvořen C_{H1} a V_H doménami z těžkého řetězce a C_L a V_L z lehkého řetězce. Tento fragment nese vazebnou aktivitu k antigenu. Fc fragment (Fragment, crystallizable) je tvořen dvěma C_{H2} a dvěma C_{H3} doménami těžkého

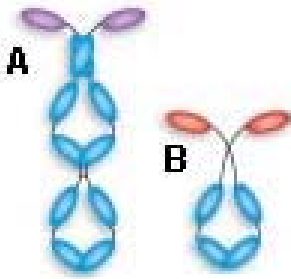
řetězce. Tento fragment nese biologickou (efektorovou) aktivitu protilátky (aktivace komplementu, atd.). Působením pepsinu se uvolní z IgG molekula $F(ab)_2$ fragmentu a molekula Fc fragmentu. Pepsin štěpí IgG pod interdoménovými cystinovými můstky mezi těžkými řetězci směrem k C-konci. V některých případech se dá při štěpení IgG pepsinem získat Fv fragment, který je nejmenší fragment který si zachovává vazebnou aktivitu (28). Síla interakcí mezi dvěma variabilními doménami Fv fragmentu závisí na sekvenci FR oblastí, a tak se stabilita Fv fragmentu liší pro každou protilátku.



Obrázek 9: Fragments protilátek získané působením proteolytických enzymů. Fab-fragment vázající antigen, Fc-fragment krystalizující, Fv-fragment variabilní. Převzato z (9).

Jako zástupce některých atypických imunoglobulinů z živočišné říše lze uvést IgNAR a Camel Ig. IgNAR (Nurse Shark Antigen Receptor) byl zatím objeven u žraloků a rejnoků. Je produkován slizinnými buňkami jako „klasické“ protilátky, ovšem neasociuje s lehkými řetězci. Těžký řetězec je tvořen pěti konstantními doménami a jednou variabilní (29). Dva těžké řetězce tvoří funkční IgNAR. Zdá se, že to je vývojově molekula zcela odlišná od „klasických“ imunoglobulinů, ale se stejnou funkcí a doménovou strukturou (30, 31). Zatím byly objeveny tři typy variabilních domén, které se liší svojí afinitou k antigenu, podle toho zda to jsou molekuly z prvního setkání s antigenem či zda již došlo k afinitní maturaci (32). Dalším zástupcem „podivných“, imunoglobulinům podobných molekul jsou tzv. kamelidy, které byly nalezeny u velbloudů a lam (33). Vedle konvenčního typu IgG1 obsahuje jejich sérum

i typy označené jako IgG2 a IgG3, které jsou složeny ze dvou těžkých řetězců, přičemž ty se skládají ze dvou konstantních domén (díky defektnímu sestřihu vypadává C_{H1} doména) a jedné variabilní domény. Podobně jako u IgNAR zcela chybí lehké řetězce (33, 34).

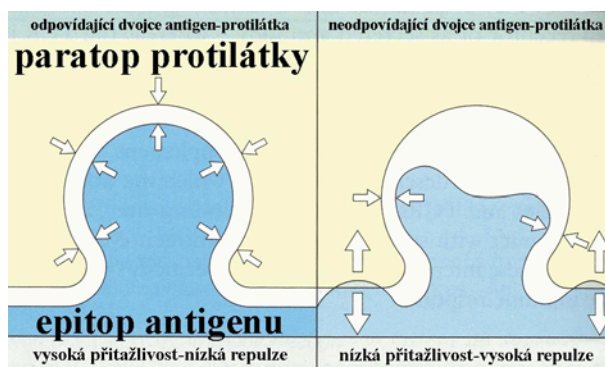


Obrázek 10: Schéma molekul **A. IgNAR**, **B. Camel Ig**. Převzato a upraveno z (35).

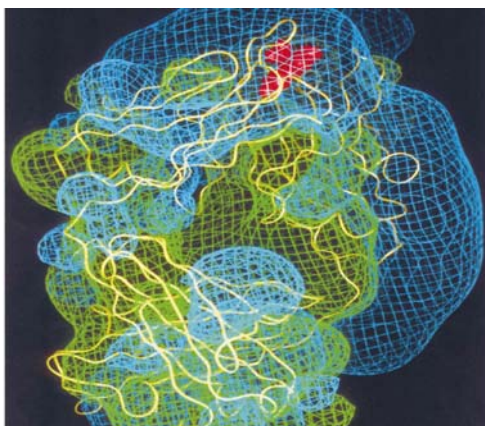
2.1.2 Povaha interakcí antigen-protilátka

Rozpoznávání antigenu protilátkou je podstatou imunitní reakce založené na protilátkách. Vazby mezi antigenem a protilátkou jsou charakteristické svou vysokou selektivitou a afinitou a patří mezi nejvíce „vyladěné“ nekovalentní interakce, kterých jsou proteiny schopny (viz obr. 11). Znalost těchto interakcí pomáhá porozumění mechanismu vazby antigenu protilátkami. V těchto interakcích je zahrnuto více sil, které se liší jak dosahem svých polí tak i fyzikální podstatou, například elektrostatické interakce (viz obr. 12) mají daleký dosah (klesají s $1/r^2$) (36) a moduluji vazbu protilátky s antigenem ještě dříve, než dojde k tzv. antigen docking. V středních vzdálenostech se přidávají k elektrostatickým interakcím van der Waalsovy síly (klesající s $1/r^7$) a solvatační síly. Při těsném (méně než 1nm) spojení antigenu s protilátkou, kdy je antigen „zaparkován“ (z angl. docked) v „kapse“ (z angl. pocket) protilátky, se začínají uplatňovat síly s krátkým dosahem jako jsou vodíkové vazby, hydrofobní síly a van der Waalsovy síly (37, 38). Při překrytí elektronových oblaků antigenu a protilátky začnou hrát roli stérické odpudivé síly s dosahem $1/r^{12}$. Tyto síly hrají důležitou roli při určování specifity molekuly protilátky k molekule určitého antigenu (3). Superpozicí těchto silových polí získáváme rozsah a sílu těchto vysoce selektivních biomolekulových interakcí. Je třeba si uvědomit, že také struktury antigenu a protilátky (včetně jejich dynamiky) mají vliv na tyto interakce. Vazebné místo na protilátce je, vždy svým tvarem a rozložením nábojů v něm, více či méně

komplementární ke struktuře na povrchu antigenu, se kterým vytváří komplex (39). Jako u všech komplexů založených na těchto interakcích, je i vazba antigen-protilátka reverzibilní. Tuto vazbu definuje rovnovážná asociační konstanta K_{as} nebo její převrácená hodnota K_{dis} , která se pohybuje u těchto komplexů v rozmezí 10^{-6} do 10^{-12} mol/l. Čím je disociační konstanta nižší, tím je vyšší afinita protilátky k antigenu. Protilátky mají ovšem více vazebných míst, například výše zmíněné IgM jich má deset. Sílu interakce polyvalentní protilátky s antigenem popisuje avidita, která vzrůstá s afinitou jednoho vazebného místa protilátky k antigenu a počtem těchto míst na protilátce. Ovšem neplatí, že avidita je součtem afinit jednotlivých vazebných míst. Většinou bývá o řád až dva vyšší. Z toho plyne, že i molekula IgM jejíž afinita k antigenu bývá poměrně malá, může antigen vázet velmi pevně, neboť má deset vazebných míst (1, 3).



Obrázek 11: Schématické znázornění působení vazebných a odpudivých sil při vazbě antigenu na protilátku. Převzato a upraveno z (3).



Obrázek 12: Ukázka elektrostatických silových polí, „obalujících“ Fab fragment z 4-4-20 anti-fluorescein protilátky. Modře (kladný potenciál) a zeleně (záporný potenciál) je znázorněno elektrostatické silové pole, žlutě struktura Fab fragmentu a červeně fluorescein. Převzato z (40).

2.2 *Terapeutické protilátky*

V dnešní době jsou protilátky nepostradatelnými pomocníky při výzkumu i v klinické praxi. Zásadní význam pro rozmach celé této oblasti měl objev monoklonálních protilátek (mAb) Köhlera a Milsteina (41).

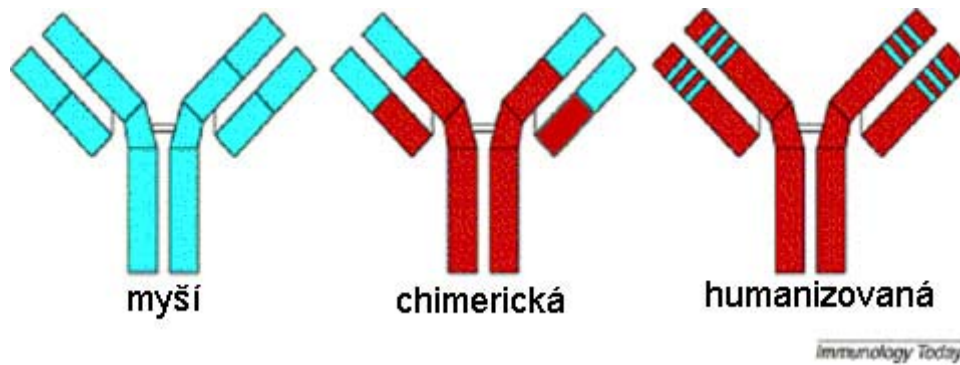
Terapeutické použití myších monoklonálních protilátek má však svá úskalí. Po několikerém podání pacientům lidský imunitní systém vyvine protilátky proti podaným monoklonálním protilátkám a tím je neutralizuje (HAMA, human anti mouse antibodies) (42, 43). I přesto se však několik myších monoklonálních protilátek začalo používat jako terapeutika, např. Bexxar (44) (GlaxoSmithKline).

Postupně bylo vyvinuto několik technik jak těmto nežádoucím reakcím předcházet. Prvním způsobem, který se použil, byly tzv. chimerické protilátky (obr. 13), které mají konstantní domény těžkých a lehkých řetězců nahrazeny lidskými (45), což je sice pokrok proti čistě myším protilátkám, ale přesto i proti těmto protilátkám se tvořila imunitní odpověď; jako příklad chimerické protilátky je možné uvést Erbitux (Bristol-Meyers Squibb; Merck).

Dalším krokem k získání vhodných terapeutických protilátek byla jejich humanizace (obr. 13). Tedy proces, při kterém jsou za lidské nahrazeny i oblasti FR variabilních domén, takže myši zůstávají pouze CDR úseky (45). Tím se minimalizuje imunitní odpověď pacienta proti terapeutické protilátce, neboť CDR sekvencí je téměř nekonečné množství kombinací a tak je velmi nepravděpodobné, že by tyto oblasti vyvolaly imunitní odpověď (pokud nepočítáme tvorbu antiidiotypových protilátek). Jako zástupce humanizovaných terapeutických protilátek je možné vybrat Avastin či Raptivu (Genentech).

Nejlepší, ovšem jen velmi obtížně připravitelné jsou lidské protilátky. Ty obsahují jen lidské sekvence a připravují se v transgenních myších nebo z lidských hybridomů (lidské B lymfocyty imortalizované virem Epstein-Barrové). Tyto linie jsou ovšem nestálé a produkují jen malé množství protilátek (45). Na trhu je momentálně jediný zástupce, a to Humira (Abbott Laboratories).

K produkci monoklonálních a jinak pozměněných protilátek, jako již zmiňované chimerické či humanizované protilátky, existuje v současnosti několik savčích expresních systémů (46).

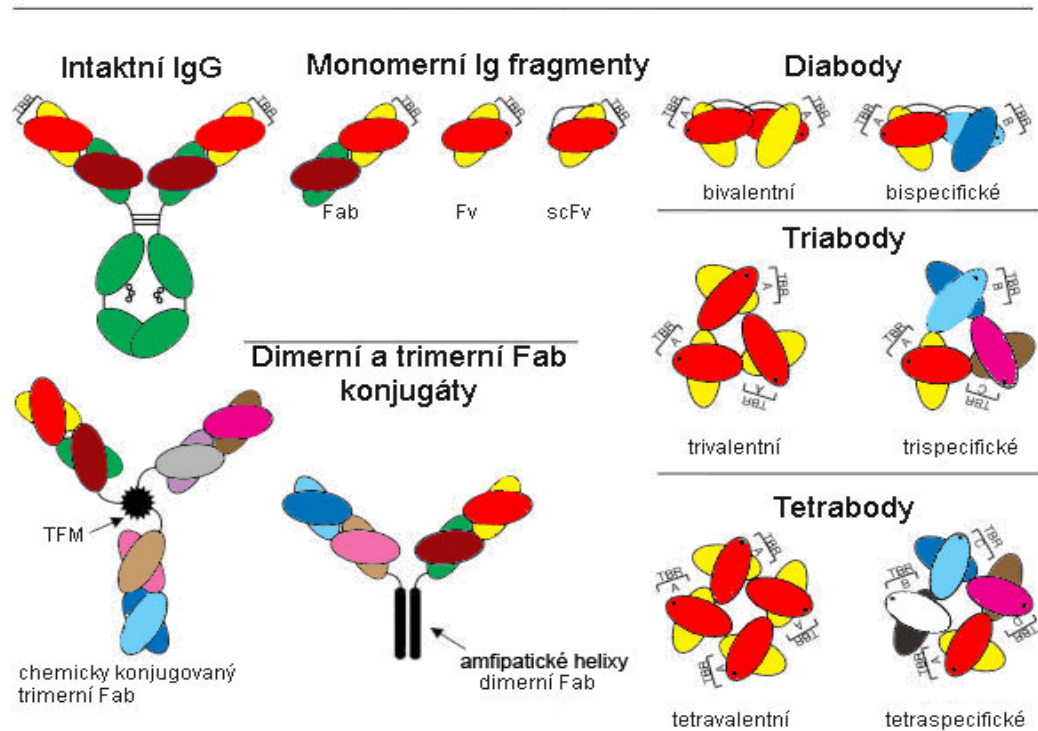


Obrázek 13: Ukázka myší, chimerické a humanizované protilátky.

2.3 Rekombinantní fragmenty protilátek

Termín rekombinantní protilátky se používá pro antigeně specifickou část (fragment) protilátky, pocházející z heterologních zdrojů (47). Rekombinantní fragmenty protilátek v sobě skrývají obrovský potenciál možného použití, díky moderním metodám proteinového a genového inženýrství. V prvních fázích šlo o přípravu co nejmenšího fragmentu, který by si zachoval vazebnou aktivitu intaktní protilátky a následně modelování velikosti vhodné pro různé aplikace nebo fúze s dalšími proteiny či jinými molekulami, které zajišťují efektorové funkce takto připravené molekuly.

Jak již bylo zmíněno, k rekombinantním fragmentům protilátek mohou být připojeny další efektorové molekuly (např. enzymy, toxiny, radionuklidy či proteiny a domény s chelatačními účinky), které zajistí těmto fragmentům další biologickou funkci. Rekombinantní fragmenty protilátek je také možno spojovat do dimerů, trimerů nebo větších agregátů, čímž se zvýší nejen jejich molekulová hmotnost, ale i funkční afinita (viz obrázek 14).



Obrázek 14: Schematické znázornění intaktního bivalentního Ig a odvozených monomerních fragmentů Fab, Fv a scFv, dále pak vícevazných forem diabody, triabody a tetrabody, a to jak monospecifických tak i polyspecifických. V a C domény jsou znázorněny jako ovály a rozdílná vazbná místa jako TBR (z angl. target binding regions) A až D. Dále jsou znázorněny i další možnosti multimerizace. Převzato a upraveno z (48).

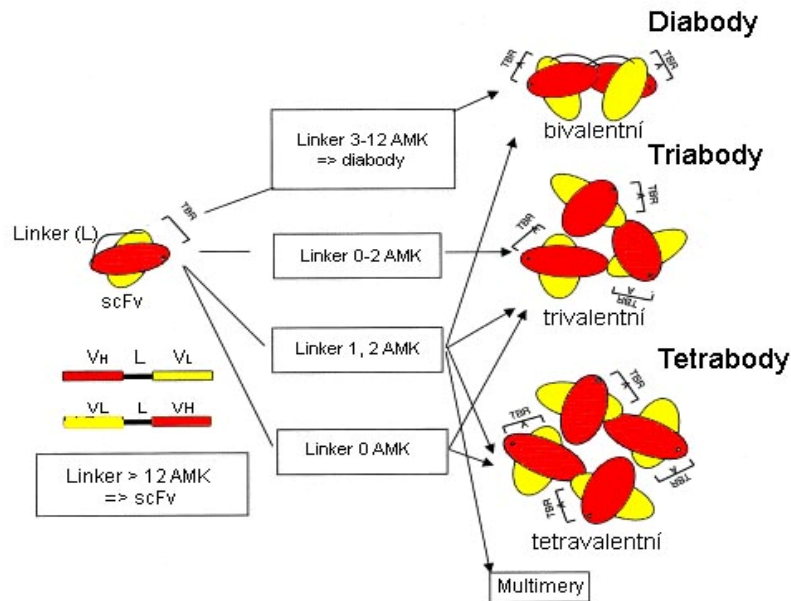
Fab fragment velmi podobný Fab fragmentu připravenému protelytickým štěpením intaktní protilátky, může být připraven také za použití metod rekombinantní DNA a heterologní exprese, ovšem výtěžek funkčního proteinu je často výrazně nižší než u Fv fragmentů; celkový výtěžek také silně závisí na konkrétní sekvenci protilátky (49). Fv fragmenty jsou nejmenší molekuly (odvozené od „klasických“ protilátek), které si ještě zachovaly úplné vazebné místo pro antigen. Jejich relativní malá velikost a jejich snadná produkce v *E. coli* z nich dělá vhodný výchozí bod pro proteinové inženýrství.

Fv fragmenty (cca 25-30 kDa) jsou limitovány svou stabilitou danou disociací dvou domén: těžké variabilní domény (V_H) a lehké variabilní domény (V_L). Disociační konstanta komplexu těchto domén byla určena různými metodami na 10^{-6} až 10^{-9} M (28, 50-52). Existují různé přístupy stabilizující asociaci V_H a V_L domén. Tyto dvě domény je možné kovalentně spojit buď pomocí flexibilního linkeru, za vzniku tzv. scFv (z angl. single-chain Fv fragment) (53, 54), anebo pomocí disulfidických vazeb, vnesením jednoho či více cysteinů do každé domény. Tímto vznikají tzv. dsFv fragmenty (z angl. disulfide-stabilized Fv fragment) (55, 56). Další

způsob stabilizace domén je přidání různých dimerizačních domén a motivů, jako např. helixů, vedoucích např. ke vzniku tzv. hsFv (z angl. helix-stabilized Fv fragment) (57). Tyto přístupy je možné i kombinovat a stabilizovat např. scFv disulfidickou vazbou, čímž se dá zvýšit termální stabilita příslušného scFv (58).

Zvláštním druhem scFv jsou tzv. intrabody. Jde o scFv fragmenty produkované do cytoplasmatického prostoru buněk za účelem vazby na příslušný cytoplasmatický protein či cílené směrování intrabody do některého buněčného kompartmentu např. endoplasmatického retikula (retenční aminokyselinová sekvence KDEL) (59, 60). Tím je možné studovat funkci blokování proteínu *in vivo*. Tento způsob užití scFv se zatím uplatnil jen v menší míře, neboť je obtížné připravit scFv fungující v intracelulárním redukcijním prostředí, jak je patrné z řady prací (60-62).

V přípravě scFv hraje důležitou roli jaký linker spojující V_H a V_L doménu je zvolen. Pro každý jednotlivý scFv se dá najít pomocí fágového nebo ribosomálního displaye nejvhodnější linker (63-65). Ovšem ve velké většině případů, se na základě práce Huston et al. (53), používá univerzální linker, složený z glycinových a serinových zbytků $(Gly_4Ser)_3$, které dodávají linkeru flexibilitu, zvyšují hydrofilicitu a odolnost k proteolýze a linker nemá tendenci interagovat s doménami (52). Linker s počtem zbytků 12 až 25 (66, 67) umožňuje dostatečnou prostorovou flexibilitu a V_H a V_L domény tak mohou vytvořit přednostně Fv fragment s jedním vazebným místem s obdobnou afinitou jako Fab fragment z původní protilátky (68-70). Zkrácením délky linkeru na 12 až 5 aminokyselin, se znemožní interakce V_H a V_L domén z téhož polypeptidového řetězce a tvoří se dimery, tzv. „diabodies“ (71-74), a to tak, že variabilní domény se dostávají do funkční interakce křížem, vždy lehký řetězec jednoho scFv s těžkým řetězcem druhého scFv. Struktura diabody pak odpovídá dvěma variabilním doménám výchozího imunoglobulinu a diabody je bivalentní. Vzniklý dimer scFv, diabody (cca 55 kDa), může být buď monospecifický nebo bispecifický (75, 76) (viz obrázek 14). Dalším zkrácením linkeru pod 3 aminokyseliny se začíná tvořit trimer (triabody) (71, 73) a při spojení V_H a V_L domén bez jediné aminokyseliny v linkeru dojde k tvorbě tetrameru (tetrabody) (63) (viz obrázek 15). Ve většině případů byla pro řadu scFv fragmentů pozorována rovnováha mezi monomerem, dimerem či trimerem a tetramerem. O tom, která forma bude preferována, rozhoduje nejen délka a aminokyselinové složení linkeru, ale i orientace domén, aminokyselinová sekvence daného scFv (48, 77), pH a iontová síla pufru, koncentrace proteinu, přítomnost antigenu a způsob exprese a refoldingu (78).



Obrázek 15: Vliv délky linkeru na tvorbu vícevazných molekul scFv fragmentů. Variabilní domény jsou reprezentovány jako ovály, červenou barvou V_H a žlutou V_L. TBR označuje vazné místo. Převzato z (47).

Dalšími ze zástupců rekombinantních fragmentů protilátek jsou fragmenty odvozené z kamelidů a zvláštních IgNAR. Jak již bylo řečeno, tyto „podivné“ protilátky jsou tvořeny pouze těžkými řetězci a za vazbu antigenu je odpovědná pouze variabilní doména těžkého řetězce. Toho bylo využito při konstrukci fragmentů, které jsou ještě menší než Fv fragmenty, neboť jsou tvořeny pouze variabilní těžkou doménou V_H (34, 35, 79). Architektura V_H domény u kamelidů je podobná lidské. Jde o dva β-listy spojené disulfidickou vazbou (80, 81) mezi Cys zbytky v polohách 22 a 92. Rozdíl je v aminokyselinách, které jsou v klasickém IgG v kontaktu s V_L doménou. Místo hydrofobních aminokyselin jsou u kamelidů aminokyseliny hydrofilní v polohách 44 a 45 (Gly44Glx, Leu45Arg/Cys). Změna lidské V_H domény na kamelid zahrnuje záměnu 4 aminokyselin v již zmíněných polohách 44, 45 a dále 37, 47 (Val37Tyr, Tpr47Leu/Gly) (34). Tyto záměny zvyšují rozpustnost samotné V_H domény (81). Takto pozměněné konvenční V_H domény je možné i spojit a získat bispecifické rekombinantní protilátky, jejichž velikost je pouze okolo 30 000 Da (82). Ztráta lehké variabilní domény nemusí znamenat snížení disociační konstanty komplexu antigen-protilátka (kamelid), jak ukazuje práce Spinelli et al. 2000 (83). Změna klasických V_H na „žraločí“ není tak jednoduše proveditelná pomocí záměn několika aminokyselin, jako tomu je u kamelidů. Existuje totiž několik typů IgNAR (1 až 3) a ty se mezi sebou liší, ale několik pozic v aminokyselinové sekvenci je shodných pro „kamelidy“ i „žraločí“ protilátky, např. Tyr37 či Glu 46, jež zajišťují hydrofilnost této části V_H domény (32).

2.3.1 Přístupy k produkci rekombinantních fragmentů protilátek

K expresi rekombinantních fragmentů protilátek se v současnosti používá několik expresních systémů, v závislosti na požadované glykosylaci, množství či dostupnosti a finanční náročnosti. Pro expresi glykosylovaných forem rekombinantních fragmentů a terapeuticky používaných protilátek se používají savčí buňky COS (opičí ledvinové buňky transformované virem SV40) či CHO (křeččí ovariární buňky) (46, 76). Ovšem produkce rekombinantních proteinů v těchto systémech je velmi nákladná a hledají se způsoby přípravy transgenních zvířat jako jsou krávy či kozy a produkce rekombinantních proteinů do mléka, což by výrazně snížilo cenu těchto preparátů (asi 20x) (43). Dalšími systémy vhodnými pro expresi glykosylovaných forem rekombinantních fragmentů protilátek jsou hmyzí S2 buňky (76, 84) a kvasinky např. *Pichia pastoris* (85, 86). Velmi lákavým systémem na produkci rekombinantních protilátek a jejich fragmentů se jeví rostliny. Protilátky takto získané se nazývají „plantibodies“ (87), produkce je možná např. v tabáku, mechu, rajčatech, sóje, bramborách, atd. (88-90). Při použití signální sekvence je možné produkovat tyto molekuly do tzv. intersticiálního prostoru mezi rostlinnými buňkami. Takto produkované fragmenty či protilátky se uvolní z listů prostým vymytím (91). Výhodou je relativně velké množství, počáteční čistota takto získaných proteinů a nízké riziko kontaminace endotoxiny (bakteriální exprese), priony či viry (transgenní zvířata, savčí buňky) (88, 92). Podle práce Bruyns et al. 1996 mají scFv produkované v bakteriích a rostlinách srovnatelné schopnosti vázat antigen (93). Dalším možným způsobem produkce protilátek a jejich fragmentů je v buněčném extraktu (cell-free system). Tento způsob je vhodný hlavně v případech, kdy je protilátka konjugována s extrémně cytotoxickou molekulou (94).

Asi nejpoužívanějším systémem na produkci fragmentů protilátek je exprese v bakteriích, hlavně *E. coli*. Bakteriální exprese má mnoho výhod: rychlost, cena, jednoduchost molekulárního klonování a množství produkováného proteinu, které může dosáhnout až 30 % celkového množství bakteriálních proteinů (76). Existují dva hlavní přístupy k expresi scFv fragmentů v *E. coli* a to buď do cytoplasmatického nebo periplasmatického prostoru (95-98). ScFv fragmenty exprimované do periplasmatického prostoru jsou již složeny do správné konformace díky oxidujícímu prostředí v periplasmě, které umožňuje správné spárování cysteinů účastnících se disulfidické

vazby (99). Správné sbalení proteinu exprimovaného do periplasmatického prostoru je závislé na teplotě, bakteriálním kmeni, přítomnosti chaperoninů a aminokyselinové sekvenci exprimovaného proteinu (100). Nevýhodou tohoto systému je malý objem periplasmatického prostoru a tudíž i menší výtěžky proteinů, zde exprimovaných. Alternativním způsobem získávání funkčních scFv fragmentů je renaturace cytoplasmatických nebo periplasmatických inkluzí (101, 102). Úspěšnost tohoto postupu velmi závisí na konkrétním scFv fragmentu a pro jednotlivé scFv fragmenty se může velmi lišit.

Bylo vyvinuto mnoho expresních vektorů a používá se několik signálních peptidů, které řídí transport proteinu do periplasmy, např. pelB leader (103) (Bacterial pectate lyase), ovšem úspěšnost jednotlivých metod závisí na konkrétním exprimovaném scFv fragmentu. Navzdory vysoké homologii různých protilátek se úspěšnost produkce a renaturace může lišit o několik řádů. I mutace jediného kodonu může mít dramatický vliv na expresi, stabilitu scFv fragmentu (104-108) nebo způsobit až 65 násobné zvýšení afinity (109).

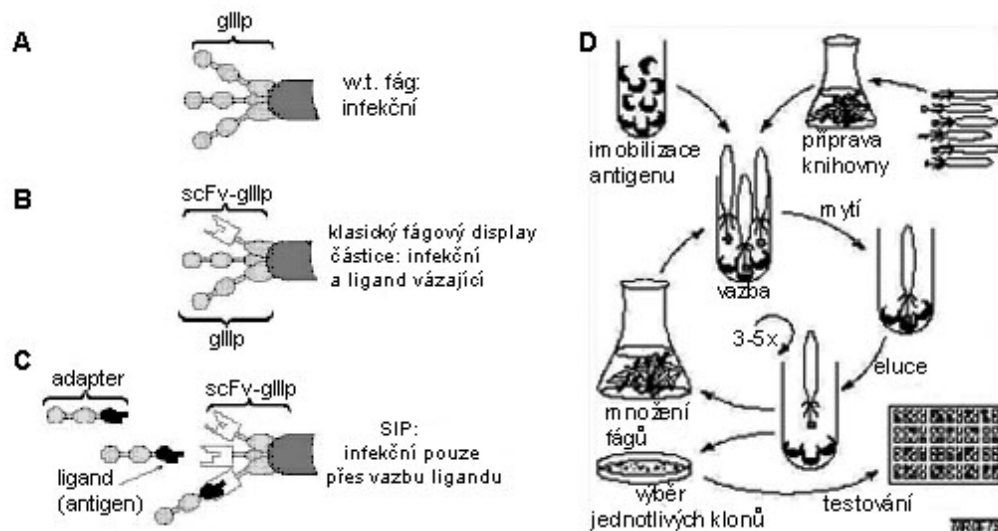
Bakterie *E. coli* se rovněž využívá pro *in vivo* zlepšování afinity pomocí speciálních mutátorových kmenů *E. coli* např. *E. coli* mutD5-FIT, které produkují substituční mutace (náhrada jedné báze jinou) s rychlostí 10^5 větší než „normální“ kmeny *E. coli*. K výběru mutantů s nejvyšší afinitou se používá vhodný prezentující a selekční systém jako např. fágový display (110).

Bakteriální exprese má ovšem svá omezení: *E. coli* se příliš nehodí pro expresi celých molekul protilátek a při produkci Fab fragmentů dává jen omezené výtěžky (47, 111). Zde je nutné doplnit, že se v poslední době objevily práce, které popisují úspěšnou expresi (1 mg čistého IgG z 1 litru bakteriální kultury (112) a až 130 mg při použití fermentorů (113)) kompletních neglykosylovaných molekul IgG do periplasmatického prostoru *E. coli*. Tyto neglykosylované protilátky se nelišily od glykosylované formy co do délky poločasu života v tělním oběhu po podání pokusným šimpanzům a pouze efektorové funkce závislé na glykosylaci (jako je například vazba C1q a FcγR1) byly porušené (113).

2.3.2 Afinitní maturace / *in vitro* evoluce

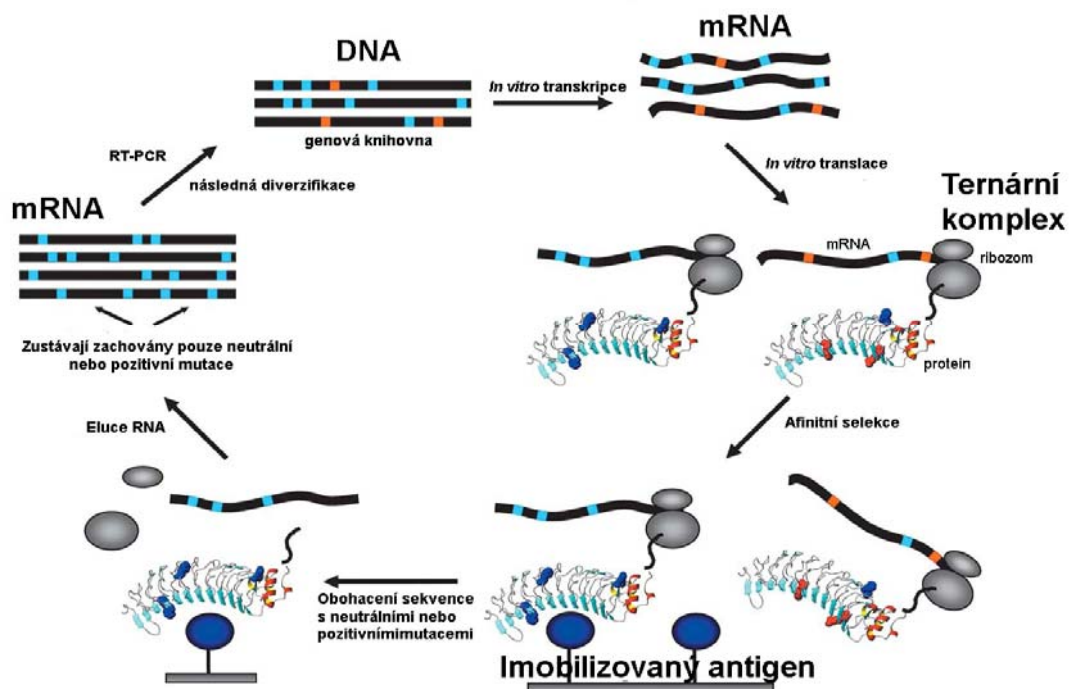
Při hledání klonů rekombinantních fragmentů protilátek s nejvyšší afinitou k danému antigenu se v současnosti používají zejména dvě metody: fágový a ribosomální display. Fágový display je nejrozšířenější a nejpoužívanější metoda pro selekci vysoce afinních rekombinantních protilátek. Při fágovém displayi je „sbírka“ rekombinantních scFv fragmentů prezentována na povrchu fága typu M13 (114) ve formě fúzního proteinu s gIIIp, malým povrchovým proteinem důležitým pro infekční cyklus fága (115, 116). Důležité je, že fág prezentující příslušný klon rekombinantní protilátky v sobě nese i DNA toho klonu, fenotyp a genotyp jsou zde tedy těsně svázané. Je-li antigen imobilizován na stěnu zkumavky nebo mikrotitrační destičky, lze při tzv. panningu vyvázat z kolekce fágů ty, které nesou na povrchu scFv fragmenty s nejvyšší afinitou k antigenu. Několikrát opakovaním cyklu (vazba, eluce fága, infekce a pomnožení fágů) lze postupně, v závislosti na podmínkách panningu (např. postupně zvyšovaná teplota, nebo rostoucí koncentrace guanidinu), selektovat fágy nesoucí scFv s vyšší afinitou a stabilitou (117-122). Při pomnožování fága mezi jednotlivými cykly se pro zvýšení mutační rychlosti s výhodou používají mutátorové kmeny *E.coli* již zmíněné výše.

Též se používá modifikovaná verze fágového displaye, tzv. SIP display (z angl. Selective Infection Phage), která je založena na tom, že rozpoznání antigenu protilátkou je integrální součástí procesu fágové infekce následující po eluci fága vázaného na imobilizovaný antigen (123). Antigen je spojen s N-koncovou částí gIIIp proteinu (domény N1 a N2) a rekombinantní scFv fragment je spojen s C-koncovou částí gIIIp proteinu (CT doména), která je vystavena na fágu. Množení fága v bakteriální kultuře představuje jednoduchou metodu selekce rekombinantní protilátky s nejvyšší afinitou k danému antigenu (viz obrázek 16).



Obrázek 16: Princip fágového displaye: A. gIIIp protein přirozeného typu fága. B. scFv fúzovaný k na N-konci gIIIp proteinu při standardním provedení fágového displaye. C. gIIIp proteinu při SIP. Převzato a upraveno z (123). D. Schéma panningu klasického fágového displaye. Převzato a upraveno z (124).

Alternativou k fágovému displayi je tzv. ribosomální display, v současnosti rychle se rozvíjející technika pro *in vitro* evoluci a maturaci rekombinantních protilátek. Poprvé tento postup popsán v práci Mattheakis et al. 1994 (125) a byl rozvinut do řady variací (126, 127). Ribosomální display má několik výhod proti již popsanému fágovému displayi: umožňuje tvorbu větších knihoven o velikosti až 10^{14} klonů (128), eliminuje transformační a klonovací kroky, které mohou být pracné s velkými fágovými knihovnami a mohou vést ke ztrátě diverzity (129). Na obr. 17 je schematicky ilustrován princip metody.



Obrázek 17: Princip ribosomálního display při testování knihoven protilátek na vazbu antigenu. DNA knihovna scFv fragmentů je přepsána *in vitro* do mRNA pomocí RNA polymerázy. Tato mRNA knihovna je přeložena do knihovny proteinů za použití translační mašinerie v extraktu bakteriálního (130) nebo eukaryotického (131, 132) původu. Vazba genotypu s fenotypem je zajištěna tvorbou stabilního ternárního komplexu mRNA, ribosomu a nově syntetizovaného proteinu; aby se tak stalo, nese mRNA stop kodon a na 3'-konci kóduje spacer, který umožňuje, aby celý nascentní scFv polypeptid „vystoupil“ z ribosomu. Žádaný ribosomální komplex je následně vybrán z inkubační směsi vazbou k imobilizovanému antigenu (ligandu). Komplexy s klony bez specifity k imobilizovanému antigenu jsou odstraněny intenzivním mytím. Navázaný ribosomální komplex je následně eluován antigenem a mRNA je reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Tato cDNA může být amplifikována PCR, čímž se vnesou náhodné mutace a následně použita pro další cyklus, nebo sekvenována (130, 133, 134). Převzato a upraveno z (135).

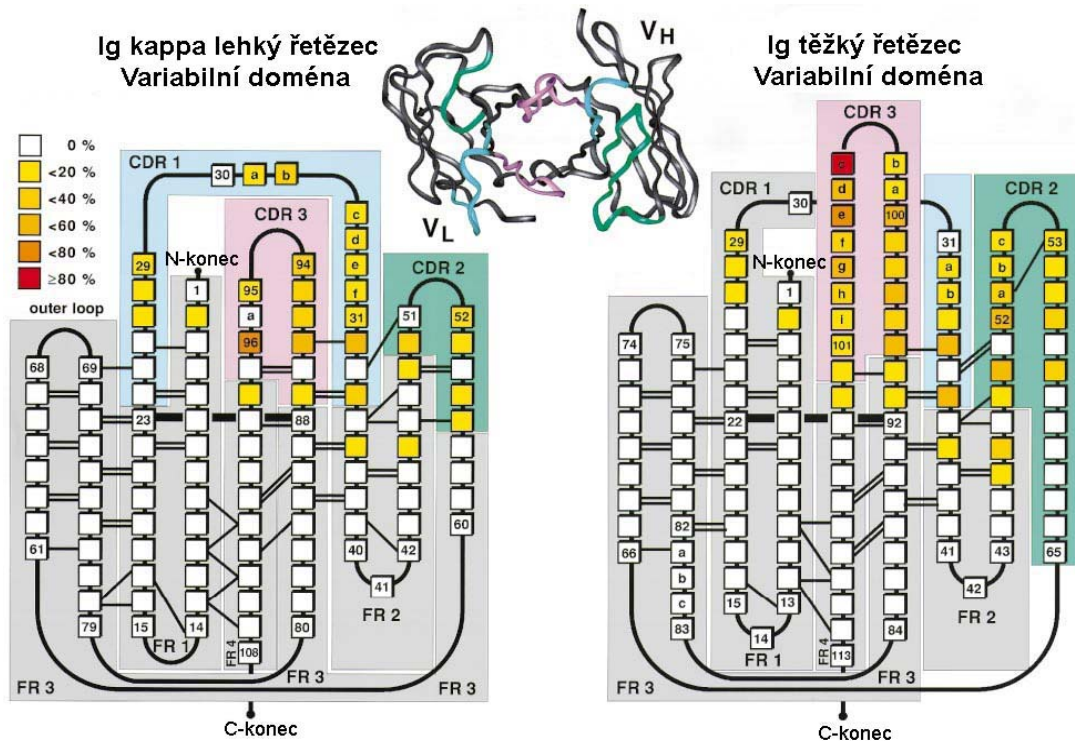
2.3.3 Metody humanizace rekombinantních protilátek

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.5.1, jsou rekombinantní protilátky odvozené z myši či jiných zvířat nevhodné ke klinickému použití v humání medicíně a z etického hlediska je nepřijatelné vytvářet humání protilátky imunizací člověka (kromě očkování). Proto je třeba hledat postupy k humanizaci rekombinantních protilátek z jiných organismů. V principu jde o nahrazení CDR sekvencí odpovědných za vazbu antigenu v lidské protilátce za CDR sekvence vhodné myši protilátky. Bohužel toto nejde prostým vložením myších sekvencí na DNA úrovni. Některé „myši“ aminokyseliny mimo CDR oblasti je třeba zachovat pro správné prostorové uspořádání

hypervariabilních oblastí a některé aminokyseliny z CDR oblastí vyměnit za „lidské“ pro dosažení co nejnižší imunogenicity.

Některé aminokyseliny v CDR oblastech (pozice 33 a 50 v těžkém řetězci a 32, 34, 90, 91 a 96 v lehkém řetězci) jsou konzervované napříč několika protilátkami se specifitou ke stejnému antigenu, a zdá se tak, že tyto aminokyseliny hrají nejdůležitější roli právě při vazbě daného antigenu (136). Naopak záměnou, delecí nebo inzercí aminokyselin v méně exponovaných polohách CDR oblastí je možné zlepšit specifitu a afinitu protilátky k antigenu. Obecně se dá říci, že vazbě velkých molekul lépe vyhovují krátké smyčky CDR, kdežto pro vazbu malých molekul antigenu se hodí spíše dlouhé smyčky, které vytváří dutiny (137). Ovšem i mutace aminokyselin v již zmíněných konzervovaných polohách může výrazně změnit (zvýšit či snížit) jak stabilitu tak afinitu příslušné protilátky (138).

Další důležitou polohou je poloha 71 (Ala nebo Arg) ve třetím (F3) frameworku těžké variabilní domény, která se podílí na prostorové orientaci H2 smyčky (139, 140). Velmi důležité pro strukturu jsou i pozice 6, 7, 9 (10) v prvním (F1) frameworku V_H domény. V pozici 6 se vyskytují pouze Glu nebo Gln, jejichž záměnou, ke které může dojít při klonování s použitím degenerovaných primerů, může dojít k poklesu afinity a stejně tak i stability (141). V poloze 9 (10) se vyskytuje pouze Gly (142). Pro snadnější představu prostorové orientace jednotlivých zmíněných aminokyselin je přiložen obrázek 18.



Obrázek 18: Schematické znázornění V_L a V_H domén s barevným označením CDR a frameworkových oblastí v myši protilátce. CDR oblasti 1 až 3 jsou označeny modrou, zelenou a růžovou barvou. Frameworkové oblasti jsou značené šedou barvou. Barevné značení zbytků v jednotlivých polohách (od bílé přes žlutou po červenou) značí zmenšení povrchu přístupného rozpouštědлу po vazbě antigenu. Převzato a upraveno z (140).

Velice vhodný framework, který je možné obecně využít při humanizacích, je použit v humanizované protilátce humAb4D5 (143). Dalšími lidskými frameworky, které byly použity při humanizaci jsou např. DP-47 pro V_H doménu a DPL16 či DPL 22 pro V_L doménu (144, 145), které umožňují snadnou bakteriální expresi a přitom se vyskytují u velkého počtu lidí (146).

Při humanizaci protilátek většinou dojde k výraznému poklesu afinity. Někdy stačí jediná mutace ve framework oblasti, která umožní správnou orientaci CDR oblasti k antigenu na získání afinity původní myši protilátky (147).

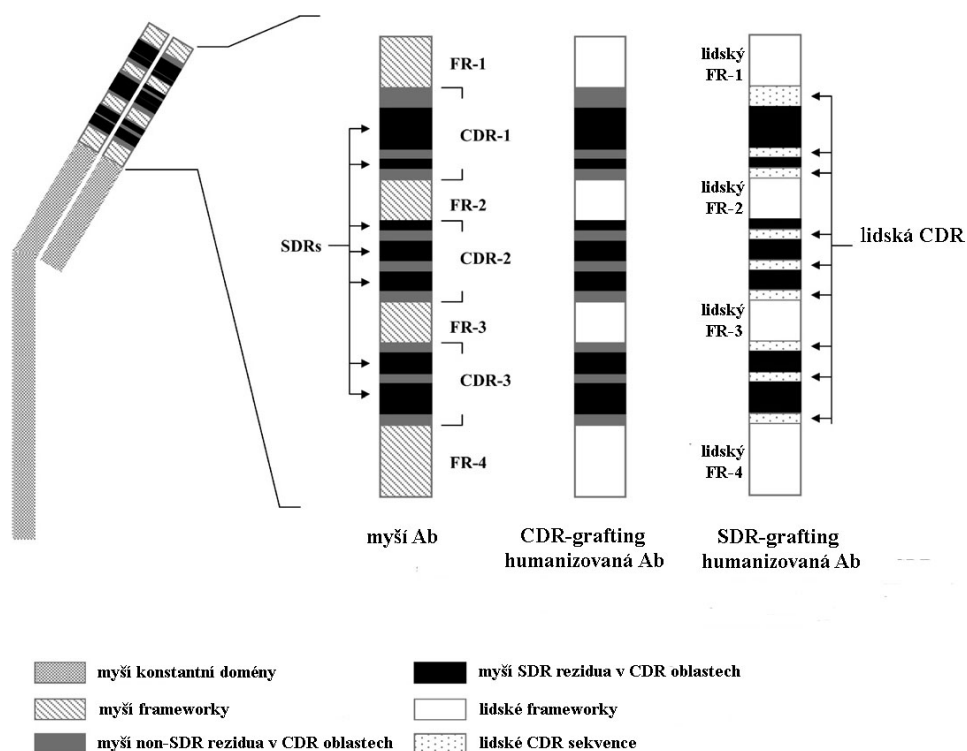
Postup při humanizaci pomocí roubování CDR smyček může být následující: data získaná z rentgenostrukturní analýzy příslušné protilátky či fragmentu a korespondujících struktur nalezených např. v PDB (Protein Data Bank, <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) se zašlou do VAST (web-based least-squares structural alignment server) s požadavkem na nalezení nejvhodnějších frameworků na CDR grafting. Ze souboru takto nalezených frameworků se následně vyberou ty, které mají aminokyselinovou sekvenci co nejpodobnější sekvenci protilátky, ze které

chceme přenést CDR sekvence (148). Někdy se rovnou volí lidský framework, jehož sekvence je co nejbližší sekvenci původní myší protilátky (149). Jiný přístup vychází z kombinatoriálních fágových knihoven, obsahující všechny možné kombinace myších a lidských aminokyselin v klíčových pozicích (150).

Velmi zajímavý přístup je popsán v práci Knappik et al. 2000 (140). Jde o vytvoření plně syntetické kombinatoriální knihovny protilátek. Autoři porovnali sekvence lidských protilátek se sekvencemi genů pro protilátky a zjistili, že mnoho z těchto genů se nikdy nebo jen zřídka „použije“ při imunitní odpovědi. Téměř 95 % protilátek, které se účastní imunitních reakcí, pochází ze sedmi genů pro V_H a sedmi genů pro V_L domény. Každá z lidských V_H a V_L podrodin, která se často vyskytuje při imunitních odpovědích, je prezentována jednou konsensuální sekvencí frameworků. To vede ke vzniku sedmi HuCAL (Human Combinatorial Antibody Libraries) genů pro těžký a sedmi pro lehký řetězec (celkem 49 kombinací). Všechny geny jsou syntetické a navrženy s přihlédnutím k praktickým požadavkům klonování a exprese; jsou např. vypuštěny všechny aminokyselinové zbytky, které podporují agregaci proteinu, předem jsou připravena restriční místa ohraničující CDR sekvence apod. Obdobného principu bylo již použito např. v pracích (149, 151).

Relativně nové jsou práce, které popisují humanizaci a *in vitro* evoluci rekombinantních protilátek pomocí metod CDR nebo framework „shuffling“. Při CDR „shufflingu“ se do vybraného frameworku vkládají celé náhodné CDR sekvence (144). Při framework „shufflingu“ je princip stejný, jen postup k tvorbě rekombinantní humanizované protilátky je obrácený. K vybraným myším CDR sekvencím, pocházejících z protilátky s vhodnou specifitou jsou náhodně přiřazovány různé lidské frameworky (152). Z takto vytvořených knihoven rekombinantních protilátek jsou následně pomocí některé ze selekčních metod (fágový nebo ribosomální display) vybrány ty klony, které mají nejlepší vlastnosti z hlediska stability a afinity.

Asi „nejkonzervativnější“ metoda (při níž se vyměňuje minimum aminokyselin) je SDR (Specificity Determining Residues) grafting. Při této metodě jsou na základě 3D struktury protilátky s antigenem vytipovány aminokyselinové zbytky, které se v rámci CDR sekvence přímo účastní vazby antigenu. Tyto aminokyseliny jsou pak přeneseny do vhodné lidské protilátky (obr. 19). Klony s nejlepšími vlastnostmi jsou opět vybrány pomocí fágového nebo ribosomálního displaye (153).



Obrázek 19: Schematicky znázorněné rozdíly mezi „CDR-graftingem“ a „SDR-graftingem“ na V_L doméně, FR (framework), CDR (Complementarity Determining Region), SDR (Specificity Determining Residues). Převzato a upraveno z (153).

2.4 Farmaceutické využití protilátek a jejich fragmentů

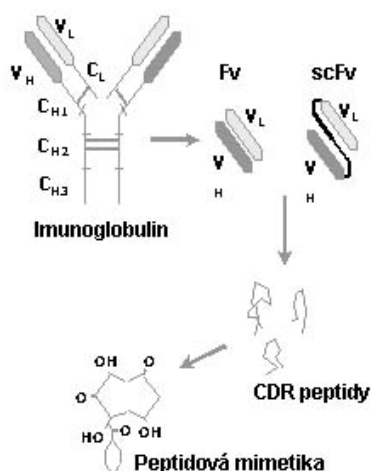
Farmaceutické využití rekombinantních protilátek je v současnosti velmi „horké“ téma a farmaceutické společnosti vynakládají nemalé prostředky na výzkum cílených terapeutik (45, 74, 154). Rekombinantní protilátky mohou v místě působení cíleně vyvolávat mnohé efekty v závislosti na jejich „náložích“; biologické účinky mohou být přirozené, jako je aktivace komplementu, indukce apoptosy, inhibice proliferace či buněčná cytotoxicita, nebo umělé např. radioaktivita či cytotoxicita založená na molekulách jako je ricin, doxorubicin a jiné (155-158). Další cestou je využití strukturních poznatků o architektuře vazebného místa protilátky k návrhu nízkomolekulárních léčiv (159).

2.4.1 Návrh farmakologicky zajímavých látek, odvozených z protilátek

Použití celých molekul protilátek v klinické praxi naráží na řadu obtíží, hlavně technického charakteru, včetně imunitní odpovědi příjemce na protilátky. K překonání této odpovědi se v současnosti používají humanizované protilátky (viz kap. 2.2).

Navzdory těmto modifikacím jsou zde další problémy s používáním celých protilátek plynoucí z jejich velikosti (cca. 150 kDa), které limitují jejich použití jako diagnostik či terapeutik. Díky své velikosti protilátky špatně pronikají do buněk, tkání včetně nádorově pozměněných (160).

Rychlý vývoj v posledních letech neprodělala jen oblast vývoje rekombinantních fragmentů protilátek, ale také oblast peptidových mimetik nebo malých antigen vázajících fragmentů, které mimikují antigenní specifitu intaktní protilátky. Jak již bylo řečeno, zásadní roli při vazbě antigen-protilátka hrají CDR oblasti (obrázek 8). Protilátka má šest CDR oblastí, ale ne všechny CDR oblasti se účastní vazby antigenu stejnou měrou, některé přispívají k vazbě více a jiné méně a pouze několik aminokyselin v CDR oblastech se přímo účastní vazby (161). Z toho plyne, že malé antigen vázající peptidy mohou být navrženy podle těchto vybraných aminokyselin v podobě, která udržuje jejich orientaci ve vazebném místě. Metody počítačového modelování nebo strukturní analýza komplexů antigen-protilátka velmi usnadňují určení, které aminokyselinové zbytky jsou nezbytné pro zachování vazby. Z výsledků těchto metod se vychází při návrhu peptidů, které si zachovávají vazebnou aktivitu původní protilátky (159, 162). Peptidy ovšem nejsou vhodné pro podávání pacientům jako léčiva vzhledem k jejich snadné degradovatelnosti, možné imunogenicitě a často špatné rozpustnosti ve vodných roztocích. Řešením jsou peptidová mimetika (obrázek 20), která si zachovávají vlastnosti peptidu, potažmo protilátky, a přitom neobsahují přirozené aminokyseliny a peptidové vazby (163).



Obrázek 20: Peptidová mimetika odvozená z protilátek. Převzato a upraveno(27, 164).

2.4.2 Klinicky používané a v závěrečných zkouškách testované protilátky a jejich fragmenty

Pro přehlednost byla tato kapitola pojata formou tabulek. U produktů již schválených (tabulka 1) je zleva název společnosti produkující terapeutikum, obchodní název produktu, zisk plynoucí z prodeje produktu, antigen, typ protilátky či fragmentu, použití a rok schválení FDA. V současnosti bylo schváleno 21 terapeutik na bázi monoklonálních protilátek a jejich rekombinantních fragmentů (165).

V následné tabulce 2 jsou potenciální terapeutika na bázi monoklonálních protilátek a jejich fragmentů v různé fázi klinických testů. Tabulka obsahuje název společnosti, která produkt vyvíjí, prozatímní název produktu, fázi klinických testů a komentář. Tabulka obsahuje i produkty, které jsou již na trhu, ale nyní jsou testované proti dalším chorobám (165).

Společnost	Obchodní název	Prodej (mil.) 2005	Antigen	Typ Ab	FDA schválená indikace	Rok schválení FDA
Ortho Biotech	Orthoclone OKT3		CD3	Myší	imunosuprese	1986
Centor	ReoPro	363\$ (2004)	GP IIb/IIIa receptor	Fab Chimer.	Srdeční ischemie	1994
Genentech, Roche, BiogenIdec	Rituxan	3 300 \$	CD20	Chimer.	Non-Hodgkinův lymfom	1997
Hoffmann-La Roche	Zenapax		IL2 receptor	Chimer.	Profylaxe akutního odhojení orgánů při transplantaci ledvin	1997
Novartis	Simulect		IL2 receptor	Chimer.	Profylaxe odhojení ledvin při trasplan.	1998

MedImmune	Synagis	1 063 \$	RSV (respiratory syncytial virus)	Humaniz.	Prevence proti nemocem z RSV (respiratory syncytial virus)	1998
Centocor	Remicade	3 477 \$	TNF- α (tumory nekrotizující faktor- α)	Chimer.	Revm. artritida, Crohnova choroba, ulcerativní colitida, psoriatická artritida	1998
Genentech, Roche	Herceptin	1 700 \$	HER2 protein	Humaniz.	Metastazující karcinom prsu	1998
Wyeth	Mylotarg		CD33	Humaniz.	Myeloidní leukémie	2000
Genzyme	Campath		CD52	Humaniz.	Chronická lymfatická leukémie	2001
Biogen Idec	Zevalin	18,7 \$ (USA 2004)	CD20	Myši (značená In-111 a Y-90)	Non-Hodgkinův lymfom	2002
Abbott Laboratories	Humira	1 400 \$	TNF- α	Lidská	Revm. artritida, psoriatická artritida	2002
Genentech, Novartis, Tanox, Roche	Xolair	321 \$	IgE	Humaniz.	astma	2003
GlaxoSmithKline	Bexxar		CD20	Myši (značená I-131)	Non-Hodgkinův lymfom	2003
Genentech, Roche	Raptiva	79 \$	CD11a	Humaniz.	psoriáza	2003
ImClone Systems, Bristol-Myers Squibb, Merck KGaA	Erbitux	413 \$	EGFR (epidermal growth factor receptor)	Chimer.	EGFR-exprimující metastazující kolorektální karcinom	2004
Genentech, Roche	Avastin	1 700 \$	VEGF (vascular endothelial growth factor)	Humani. rekomb. fragment	Metastazující nádory tlustého střeva akonečnicku	2004
Amgen	Vectibix		EGFR (epidermal growth factor receptor)	Lidská	Kolorektální karcinom	2006
Genentech, Novartis, Ophthalmics, Roche	Lucentis		VEGF	Fab	Inhibice angiogeneze	2006
Biogen Idec BV	Tysabri		VLA4 (receptor na T buňkách)	Humaniz.	Roztroušená skleróza	2006
Alexion Pharmaceuticals	Soliris		protein C5, komplement	Humaniz.	Paroxysmální noční hemoglo-binurie (PHN)	2007

Tabulka 1: Přehled současně využívaných protilátek a jejich fragmentů v terapii podle FDA. Tam kde údaje chybí, je pole necháno prázdné. Převzato a upraveno (165).

2 Teoretický úvod

Společnost	Prozatímní název produktu	Typ protilátky	Fáze klin. testů	Indikace ke schválení FDA
Amgen	panitumumab	Lidská	Fáze III	Kolorektální karcinom
Aphton	IGN101	Myši	Fáze II/III	Nádorové buňky s EpCAM, léčba malobuněčného karcinomu plic
Biogen Idec	Anti-CD80 Mab		Fáze II	Non-Hodgkinův lymfom
Biogen Idec	Anti-CD23 Mab		Fáze II	Chronická lymfocytární leukémie
Cambridge Antibody Technology	CAT-3888	Myši dsFv s pseudomonád. endotoxinem	Fáze II	Leukémie z vlasatých buněk (HCL)
Genentech, Roche	Avastin	Humaniz. rekomb. fragment		Metastazující karcinom prsu, malobuněčný karcinom plic a nádory vaječníků, prostaty, slinivky a ledvin
Genentech, Roche, Biogen Idec	Rituxan	Chimér.	Fáze III	Chronická lymfocytární leukémie
Genentech, Roche	Omnitarg		Fáze II	Rakovina vaječniku a metastazující rakovina prsu
GenMab	HuMax-CD20		Fáze III	Chronická lymfocytární leukémie (CLL) a non-Hodgkinův lymfom
GenMab	HuMax-EGRf		Fáze III	Nádory hlavy a krku
Genzyme	Campath	Humaniz.	Fáze III	Roztroušená skleróza
ImClone Systems, Bristol-Myers Squibb, Merck KGaA	Erbix	Chimér.	Fáze III	Ranné fáze kolorektálního karcinomu, malobuněčného karcinomu plic, karcinom pankreatu
ImClone Systems	CDP-791	Dimer Fab	Fáze II	Proti VEGFR-2
Immunomedics	Epratuzumab	Humaniz.	Fáze III Fáze II	Systémový lupus erytematodes, Sjögrenův syndrom
Medarex, Bristol-Myers Squibb	MDX-010	Lidská	Fáze III Fáze II	Melanom, rakovina prostaty
Medarex	MDX-060	Lidská	Fáze II	CD30 pozitivní nádory (lymfomy, Hodgkinova choroba, atd.)
Medarex	MDX-070	Lidská	Fáze II	Rakovina prostaty
Merck KGaA, EMD Pharmaceuticals	Matuzumab	Humaniz.	Fáze II	Rakovina žaludku, vaječníků, plic a děložního čípku
Pfizer, Abgenix	CP-675,206		Fáze II Fáze II	Imunomodulační účinky, Melanom
Roche	CAL	Humaniz.	Fáze II	Nádorová hyperkalcémie
Seattle Genetics	SGN-30		Fáze II	CD30 pozitivní nádory (Hodgkinova choroba, kožní lymfomy a anaplastický velkobuněčný lymfom)
Serono, Genmab	HuMax-CD-4	Lidská	Fáze III Fáze II	Kožní T-buněčné lymfomy (CTCL) Ne-kožní T-buněčné lymfomy
Serono	Adecatumumab	Lidská	Fáze II	Rakovina prostaty a prsu
United Therapeutics	OvaRex		Fáze III	Rakovina vaječniku
Abbott Laboratories	Humira	Lidská		Crohnova choroba
Abbott Laboratories	ABT-874	Lidská		Roztroušená skleróza, psoriáza, Crohnova choroba
Amgen	Denosumab	Lidská	Fáze III Fáze II	Rakovina prostaty, prsu, postmenopauzální osteoporóza Kostní metastázy, revmatoidní artritida
Amgen	AMG 108		Fáze II	Revmatoidní artritida
Amgen, Genmab	AMG 714	Lidská	Fáze II	Revmatoidní artritida
Biogen Idec, Elan	Tysabri	Humaniz.	Fáze III	Revmatoidní artritida, Crohnova choroba

Biogen Idec, PDL BioPharma	HuZAF	Humaniz.	Fáze II	Zánětlivá onemocnění
Biogen Idec, PDL BioPharma	Daclizumab	Humaniz.	Fáze II	Roztroušená skleróza
Centocor	Remicade	Chimér.	Fáze III	Dětská Crohnova choroba
Centocor, Schering-Plough	CNTO 148	Lidská	Fáze III	Úveitida, revmatoidní artritida, Crohnova choroba
Centocor	OCTNO 1275	Lidská	Fáze III	Záněť
Genentech, Roche, Biogen Idec	Rituxan	Chimér.	Fáze III	Revmatoidní artritida, systémový lupus erytematodes, roztroušená skleróza
Genentech, Roche	Ocrelizumab	Lidská	Fáze II	Revmatoidní artritida
Genmab	HuMAX-CD20	Lidská	Fáze II	Revmatoidní artritida, non-Hodgkinův lymfom, chronická lymfocytární leukémie
Genzyme	Campath	Humaniz.	Fáze III	Roztroušená skleróza
Human Genome Sciences, GlaxoSmithkline	LymphoStat-B	Lidská	Fáze II	Systémový lupus erytematodes, revmatoidní artritida
Immunomedics	Epratuzumab	Humaniz.	Fáze III Fáze II	Systémový lupus erytematodes, Sjögrenův syndrom
Millennium Pharmaceuticals	MLN1202	Humaniz.	Fáze II	Roztroušená skleróza, arteroskleróza
PDL BioPharma	Visilizumab	Humaniz.	Fáze II/III Fáze I	Ulcerativní kolitida Crohnova choroba
PDL BioPharma	Daclizumab	Humaniz.	Fáze III	Roztroušená skleróza, astma
Roche	Actemra	Humaniz.	Fáze II	Revmatoidní artritida, systémová juvenilní idiopatická artritida
Roche	Ocrelizumab	Humaniz.	Fáze III	Revmatoidní artritida
UCB	Certolizumab pegol	Humaniz. Fab	Fáze III Fáze II	Crohnova choroba, revmatoidní artritida
Alexion Pharmaceuticals	Soliris		Fáze III	Paroxysmální noční hemoglobinurie Revmatoidní artritida, nefritida
Alexion Pharmaceuticals, Procter & Gamble	Pexelizumab		Fáze III	Akutní infarkt myokardu
Centocor	ReoPro	Chimér. Fab	Fáze III Fáze II	Pro podpůrnou perkutánní koronární intervenci
Genentech, Novartis, Taxon, Roche	Xolair	Humaniz.	Fáze II	Dětské astma, Alergie na arašidy
Genentech	Raptiva	Humaniz.	Fáze III	Atopická dermatitida u dospělých
GlaxoSmithKline	Mepolizumab		Fáze II	Hypereosinofilní syndrom, esofagitida Astma, nosní polypy
Genentech	TNX-355	Lidská	Fáze I/II	Léčba HIV/AIDS (vazba na CD4 receptor)
Wyeth	MYO-029	Lidská		Svalová dystrofie
Genentech, Roche	Herceptin	Humaniz.	Fáze II	Metastazující nádory prsu
YM Biosciences, Innogene Kalbiotech Ltd.	Nimotuzumab	Humaniz.		Metastazující karcinom pankreatu, malobuněčný karcinom plic

Tabulka 2: Přehled rekombinantních protilátek a jejich fragmentů v různých fázích klinického výzkumu. V případech, kdy se požadované informace nepodařilo zjistit, jsou příslušná pole v tabulce vynechána. Převzato a upraveno z (165).

3 Cíle disertační práce

Cílem této disertační práce bylo etablovat v národním měřítku kompletní technologii produkce rekombinantních scFv fragmentů protilátek, zahrnující molekulární klonování a konstrukci různých formátů scFv, jejich expresi v různých hostitelích (*E. coli*, hmyzí S2 buňky), purifikaci a charakterizaci pomocí různých metod, od čistě imunologických (např. ELISA) po fyzikálně-chemické (ITC, DSC).

Experimenty se prováděly na několika modelových protilátkách, TU-20, M75, MEM97 a F11.2.32, s diagnostickým, případně terapeutickým potenciálem, které se lišily typem rozpoznávaného epitopu, takže byly vyzkoušeny i různé metody testování vazebné aktivity.

Konkrétní dílčí cíle tedy zahrnovaly:

1. Z hybridomových linií TU-20, M75, MEM97 a F11.2.32 připravit pomocí metod molekulárního klonování funkční rekombinantní scFv fragmenty.
2. Optimalizovat heterologní expresi scFv fragmentů ve vhodných hostitelích.
3. Jednotlivé scFv fragmenty purifikovat, testovat jejich vazebnou aktivitu pomocí vhodných metod a některé blíže charakterizovat pro budoucí výzkum a zavedení metod *in vitro* evoluce.
4. Vybrané fragmenty protilátek předat jako výchozí materiál k dalším studiím partnerům spolupracujícím při řešení grantů Eureka a Centra cílených terapeutik.

4 Metody a materiály

4.1 Buňky, vektory, média

Bakterie byly pěstovány v Luria-Bertani (LB) médiu (Sigma) doplněném o 0,5% glycerol (Lachema) a ampicilin (Biotika)(0,1 g/l) (166).

Agarové plotny obsahovaly 15 g/l LB agaru (Sigma) a dle potřeby 0,1 g/l ampicilinu a případně 5 % glukózu (Lachema).

Média použitá pro expresi v hmyzích S2 buňkách:

k transfekci – SF900II (Gibco); k selekci – SF900II doplněné o 10% fetální hovězí sérum (Gibco) a 5 µg/ml blasticidin (Invitrogen); k indukci exprese – SF900II, 1 mM CuSO₄ (Sigma). Vše dle pokynů výrobce v návodu „*Drosophila* Expression System“ (Invitrogen).

***Escherichia coli* DH5 α:** [*F*, Φ 80*dlacZ* Δ *M15*, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* (*rk*⁻,*mk*⁺), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)*U169*, λ -], byly používány pro molekulární klonování.

***Escherichia coli* BL21(DE3):** *F*⁻*ompT* [*lon*] *hsdSB* (*rB-mB*-; *E. coli* B kmen) s DE3, λ profág nesoucí T7 RNA polymerasový gen (167), byl používán jako hostitel pro expresi scFv konstruktů.

Schneiderovy (S2) buňky: hmyzí buněčná kultura odvozená z embryonálních buněk *Drosophila melanogaster* (168), byla použita k expresi glykosylovaných scFv.

HT-29: buněčná linie odvozená z nádoru (adenokarcinom) tlustého střeva

HeLa: buněčná linie odvozená z karcinomu děložního čípku

RAMOS: buněčná linie odvozená z Burkittova lymphomu

Vero: buněčná linie odvozená z adherentních epitelálních ledvinových buněk z *Cercopithecus aethiops*

pUC 18: vektor používaný pro subklonování a pro sekvenování (New England Biolabs)

pET 22b (+): vektor pro periplasmatickou expresi proteinů v buňkách *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen)

T7Q10: vektor (169) pro cytoplasmatickou expresi proteinů v *Escherichia coli* BL21(DE3).

pMT/BiP/V-5 His: vektor pro expresi heterologních proteinů do média v S2 buňkách (Invitrogen)

pCoBLAST: selekční vektor použitý pro tvorbu stabilních transfektantů navozením resistance S2 buněk proti antibiotiku Blastidicin (Invitrogen).

pcDNA3: vektor pro expresi v savčích buňkách (Invitrogen).

4.2 Metody

4.2.1 Molekulární klonování - konstrukce scFv fragmentů

Pro běžné molekulární klonování byly použity standardní postupy, jak jsou uvedeny v Sambrook et al (166) a zde budou detailněji uvedeny jen vybrané metody a přístupy tak, aby tato sekce shrnujícím způsobem poskytla návod pro případné budoucí konstrukce rekombinantních fragmentů dalších protilátek. Pro cílenou mutagenezi, kde jí bylo třeba, byl používán kit QuickChange firmy Stratagene a postupováno bylo dle návodu výrobce.

Při konstrukci scFv fragmentů pro jednotlivé mAb se vycházelo z celkové RNA izolované z buněk příslušného hybridomu: hybridomy produkující TU-20 a MEM-97 pocházely ze společnosti EXBIO Praha, a.s., hybridom pro M75 poskytl dr.J.Závada z ÚMG AV ČR, v.v.i.

cDNA kódující variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce byly získány pomocí RT-PCR, a to ve dvou krocích: nejprve byla z celkové RNA připravena cDNA, která pak sloužila jako templát v PCR reakcích.

4.2.1.1 Izolace celkové RNA

Celková RNA z cca 10^6 - 10^7 buněk byla izolována za použití činidla TRI-Reagent (Sigma) podle návodu výrobce. Typický výtěžek činil 100-150 μ g RNA, poměr A_{260}/A_{280} byl vyšší než 2,0 a integrita preparátu byla ověřena elektroforesou v 0,9% agarosovém gelu. Preparát celkové RNA byl v alikvotech (přibližně 4 μ g/3 μ l) skladován při -70°C .

4.2.1.2 Příprava cDNA

K přípravě cDNA byl použit kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen) využívající reversní transkriptasu SuperScriptII a oligo(dT) jako primery. Reakční směs, obsahující 4 μ g celkové RNA, 1 μ l směsi dNTP (10mM), 1 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 μ g/ μ l) a vodu (DEPC-ošetřenou) v celkovém objemu 10 μ l, byla

inkubována 5 min při 65 °C, přenesena do ledu, bylo k ní přidáno 9 µl zvlášť připraveného mixu (obsahujícího 2 µl 10xRT pufru [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 4 µl 25mM MgCl₂, 2 µl 0,1mM DTT a 1 µl inhibitoru RNaseOUT [40 U/µl]) a celá směs byla preinkubována 2 min při 42 °C a po přidavku 1 µl enzymu SuperScript II RT (50 U/ µl) bylo inkubováno postupně 50 min při 42 °C a 15 min při 70 °C. Po této inkubaci byl k reakční směsi na ledu přidán 1 µl RNase H (2 U/µl) a bylo inkubováno 20 min při 37 °C. Preparát cDNA byl v alikvotech (2 µl) skladován při -20 °C.

4.2.1.3 Amplifikace variabilních úseků

Primery pro PCR reakce:

N-koncové primery byly dle možnosti navrhovány podle skutečné aminokyselinové sekvence izolovaného těžkého, resp. lehkého řetězce dané protilátky (viz tabulka níže). K tomuto účelu bylo cca 10-15 µg purifikované mAb podrobena SDS-PAGE elektroforéze a po elektrotransferu na PVDF membránu podrobena N-koncové sekvenaci (laskavě provedl dr. Z. Vobůrka, ÚOCHB AV ČR, v.v.i).

	TU-20	MEM-97	M75
H	EVQLQQSG	Blokovaný	EVQVVESGGG
L	DVLMTQTP	DIQMTQSPA	DVVMTQTP

Použité primery pro primární amplifikaci:

H řetězec N-koncové

TU-20 5' GA(A,G) GT(G,C) CA(A,G) CTG CAG CA(A,G) TC(A,T) GG
 M75 5' GT(G,C) CA(A,G) GT(G,C) GA(A,G) TC(A,T) GG
 MEM97 5' AG GT(G,C) (A,C)A(A,G) CTG CAG (G,C)AG TC(A,T) GG

C-koncový (HKON)

5' G ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TT

L řetězec N-koncové

TU-20 5' GAT GT(C,T) CTG ATG AC(C,T) CA(A,G) ACT CC
 M75 5' GAT GT(C,T) GTG ATG AC(C,T) CA(A,G) ACT CC
 MEM97 5' GAT ATC CAG ATG AC(C,A) CAG TCT CC

C-koncový (LKON)

5' GA TAC AGT TGG TGC AGC ATC AGC

V primární PCR reakci tedy N-koncový primer buď reflektoval experimentálně zjištěnou aminokyselinovou sekvenci, anebo v případě blokovaného amino-konce

(H řetězec MEM-97) byla použita směs degenerovaných primerů (Orlandi et al. (1989) (170)). C-koncové primery pro oba řetězce, H i L, vždy odpovídaly konstantní oblasti těsně následující za variabilní doménou, tzn. aminokyselinovým pozicím 115-123 pro H řetězec, a 109-116 pro L řetězec (číslování dle Kabat et al. (171)).

PCR podmínky:

Reakční směs pro PCR amplifikaci DNA úseků kódujících variabilní domény lehkého nebo těžkého řetězce obsahovala v celkovém objemu 50 μ l: templát 1 μ l cDNA (připravené jak uvedeno výše), příslušné primery (finální koncentrace 0,4 μ M, v případě degenerované směsi 2-5 x molární nadbytek), nukleotid-trifosfáty (finálně 0,2 mM každý), 5 μ l 10x konc. PCR pufru (dodaného výrobcem polymerasy), 2 μ l DMSO a 0,5 μ l *Pfu* DNA polymerasy (Fermentas, 2,5 U/ μ l). Vlastní reakce pak probíhala za podmínek 94 °C 3 min; 30-krát (94 °C 40sec, 48 °C 40sec, 72 °C 45sec); 72 °C 7 min.

Produkty PCR reakce byly purifikovány elektroforézou v agarosovém gelu (1,5-2%), klonovány do pUC18 vektoru otevřeného *Sma*I a následně sekvenovány k ověření, zda „vyhovují“ charakteristické sekvenci variabilní oblasti těžkého, resp. lehkého řetězce (invariantní cysteinové zbytky, framework oblasti, nepřítomnost stop kodonů, atd). Takto byly analyzovány produkty tří nezávislých PCR reakcí pro každý řetězec.

4.2.1.4 Sestavení scFv molekul

Sekvenací ověřené primární PCR produkty (v pUC18 vektoru) pak sloužily jako templáty pro reamplifikaci, tentokrát s použitím primerů obsahujících restriční místa, jež umožňují následné postupné sestavení úseků kódujících lehké a těžké variabilní domény do scFv molekul.

Primery pro reamplifikaci těžkých řetězců:

N-koncový H(*Pst*I)

5' GA(A,G) GT(G,C) CA(A,G) CTG CAG CA(A,G) TC(A,T) GG
(tj. totožný s primerem pro TU-20 v primární PCR)

Při reamplifikaci těžkého řetězce M75 nebylo možné zavést *Pst*I místo, neboť bylo nutné zachovat přesně aminokyselinovou sekvenci N-konce (více ve výsledkové části)

5' GAA GTG CAG GTT GTG GAG TCT GGT GGA

C-koncový H (*Bst*EII)

5' TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC

Primery pro reamplifikaci lehkých řetězců:

N-koncový L (EcoRV)

5' GCC GAT ATC GTG ATG AC(C,A) CAG TCT CC pro TU-20 a M75
 5' GAT ATC CAG ATG AC(C,A) CAG TCT CC pro MEM97

C-koncový L (XhoI)

5' CCG TTT GAT CTC GAG CTT GGT CCC

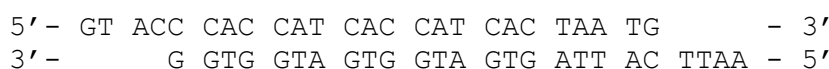
Produkty reamplifikace byly opět vneseny do pUC18 SmaI vektoru a po ověření sekvence použity k finálnímu sestavení scFv molekul. Při něm bylo využito existujícího modulu, níže schematicky znázorněného, ve kterém byl již dříve vystavěn scFv 1696 (172) a který umožňuje kazetovým způsobem vyměňovat DNA fragmenty kódující H řetězec mezi restrikčními místy PstI-BstEII, a L řetězec mezi EcoRV-XhoI místy. Ve výsledném formátu jsou tak variabilní domény spojeny prostřednictvím flexibilního, 15 aminokyselin dlouhého linkeru do jedné molekuly v orientaci [*EcoRV*(V_L)-*XhoI*]-linker-[*PstI*(V_H)-*BstEII*]. Jako linker byla zprvu použita sekvence (Gly₄Ser)₃.



Modul scFv obsahuje vedle DNA úseku kódujícího 15-aa linker mezi doménami i DNA kódující několik vysoce konzervovaných aminokyselin z N- a C-konců variabilních domén a sekvenci kódující 11 aminokyselin z C-konce lidského *c-myc* onkogenu (173), tzv. *myc*-tag (podtrženo) běžně užívaný pro snadnou identifikaci (pomocí anti-*myc* protilátky konjugované např. s křenovou peroxidasou).

4.2.1.5 Úprava scFv modulu pro purifikaci produktu na IMAC nosiči

Ve shora uvedeném scFv modulu byl mezi restrikční místa KpnI (resp. Asp718I) a EcoRI vnesen oligoduplex kódující 5 histidinových zbytků a dva stop kodony.



4.2.1.6 Konstrukce scFv pro expresi do periplasmy

Vycházelo se z komerčně dostupného vektoru pET-22(b), ve kterém je mezi místy NdeI a NcoI obsažen pelB leader zodpovědný za směrování produktu do periplasmy; inserty kódující scFv fragmenty se pak klonovaly do polylinkeru mezi NcoI (resp. EcoRV) a EcoRI místa. Jelikož tyto inserty již obsahovaly svoji vlastní histidinovou kotvu a stop kodon, byla histidinová kotva přítomná ve vektoru pET-22(b) odstraněna. K tomu účelu byl vektor nejprve linearizován štěpením enzymem Bpu1102I, dále štěpen HindIII, vzniklé konce byly zatupeny (Klenow) a vektor religací uzavřen.

4.2.1.7 Konstrukce scFv modulu pro H-L orientaci variabilních domén

Dosavadní konstrukce vycházely z již existujícího modulu scFv, ve kterém bylo pořadí domén L-linker-H.

Konstrukce modulu scFv v orientaci H-linker-L byla provedena ve 3 krocích postupným vnášením tří oligonukleotidových duplexů do výchozího plasmidu p680 (nesoucím v pUC18 insert pro scFv F11.2.32); tento plasmid byl zvolen z praktického hlediska, neboť obsahoval unikátní PstI a Asp718I restrikční místa.

NdeI | *pelB* | *NcoI* | *EcoRV* | L | *XhoI* | .. | linker | .. | *PstI* | H | *BstEII* | .. | *myc* | *Asp718I* | *HIS₅* | *EcoRI*

Do tohoto vektoru byl nejprve vnesen mezi místa XhoI a Asp718I oligonukleotidový duplex LXA.

LXA

XhoI
Asp718I

```
leu glu I K R E Q K L I S E E D L N gly
thr
TC GAG ATC AAA CGT GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT G
C TAG TTT GCA CTT GTT TTT GAG TAG AGT CTT CTC CTA GAC TTA CCA TG
```

Tím z vektoru vypadl linker s těžkým řetězcem a za lehkým řetězcem následuje ve vektoru *myc*-tag, histidinová kotva, stop kodon a EcoRI místo.

Do vzniklého produktu byl vnesen mezi místa NcoI a EcoRV oligoduplex HNE,

HNE

```

NcoI                                     1/2EcoRV
      M   E   V   Q   L   Q   T   V   T   V   S   G
C ATG GAA GTG CAG CTG CAG ACG GTC ACC GTC TCC GGA TT GAT
      CTT CAC GTC GAC GTC TGC CAG TGG CAG AGG CCT AA CTA
                PstI       BstEII       BspE1

```

kteřý přináší úplný začátek těžkého řetězce a klonovací místa PstI, BstEII a BspE1 pro další operace.

V posledním kroku byl z předcházejícího meziprojektu připraven vektor BspE1-EcoRV, do kterého byl klonován duplex GSL, který vnesl do konstrukt (Gly₄Ser)₃ linker (15 aa).

GSL

```

BspE1
1/2EcoRV
      G   G   G   G   S   G   G   G   G   S   G   G   G   G   S
CC GGA GGT GGC GGT TCA GGC GGT GGC GGA TCC GGC GGT GGC GGA TCG GAT
      T CCA CCG CCA AGT CCG CCA CCG CCT AGG CCG CCA CCG CCT AGC CTA
                BamHI

```

Finální konstrukt tedy obsahuje

```

NdeI |pelB|NcoIEVQ PstI..BstEII VS („GlySer“)₃ EcoRV | L |XhoI IKRmyc Asp718IHIS₅
EcoRI

```

a lze v něm mezi PstI-BstEII vložit jakýkoli těžký řetězec a mezi místy EcoRV-XhoI vyměnit přítomný lehký řetězec F11.2.32 za jakýkoli jiný.

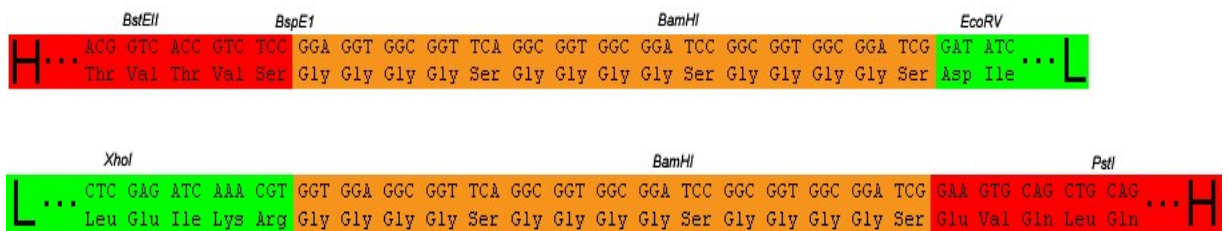
Při výše uvedené konstrukci scFv modulu došlo v posledním kroku (insece oligonukleotidového duplexu GSL) k nezamýšlené, avšak výhodné „chybě“, spočívající patrně ve vzájemném posuvu výrazně repetitivních oligonukleotidů, díky níž v jednom z produktů klonování byla sekvenací zjištěna i přítomnost čtyřnásobné repetice „Gly₄Ser“, tzn. byl takto získán scFv modul H-L orientace s linkerem o délce 20aa zbytků.

Pro M75, který (s ohledem na aminokyselinovou sekvenci) nemůže mít na začátku těžkého řetězce PstI místo (aa zbytky LQ), bylo nutné v plasmidu obsahujícím těžký

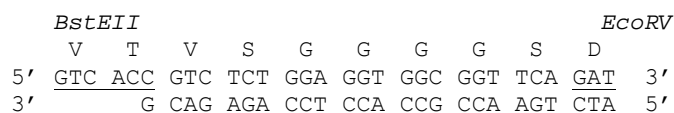
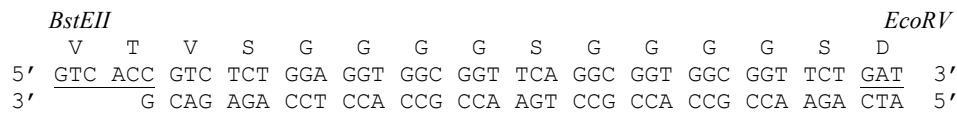
řetězec M75 vytvořit NcoI místo cílenou mutagenezí, a do universálního modulu pro scFv fragmenty v orientaci H-L pak vnést těžký řetězec jako insert NcoI-BstEII.

4.2.1.8 Konstrukce scFv se zkráceným linkerem

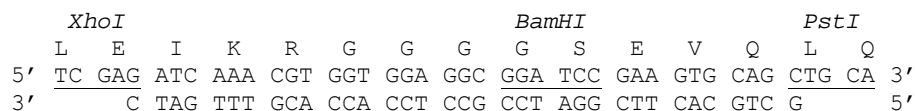
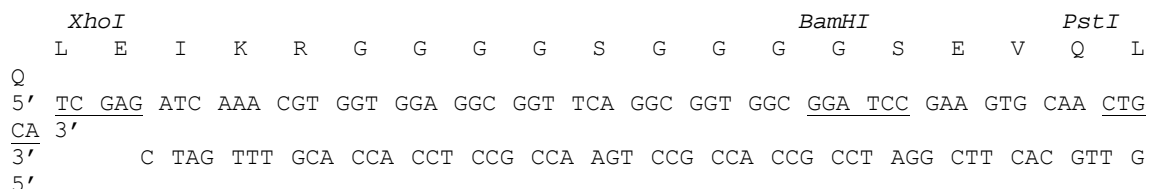
Na schématu níže je znázorněn detail linkeru o délce 15 aa v kontextu H-L, resp. L-H. Při konstruování scFv modulů se zkráceným linkerem bylo využito přiléhajících restrikčních míst, BstEII a EcoRV u H-L orientace a XhoI a PstI u L-H orientace, mezi které byly klonovány odpovídající oligonukleotidové duplexy.



Při konstrukci scFv modulu s linkerem o délce 10aa, resp. 5aa, v orientaci H-L byly mezi příslušná restrikční místa klonovány následující oligonukleotidové duplexy:



V případě konstrukce scFv se zkráceným linkerem (10aa, 5aa) v orientaci L-H, byly použity níže uvedené oligonukleotidové duplexy:



4.2.1.9 Konstrukce scFv M75 ve formátu L-20-H

Pro možnost přímého srovnání scFv M75 fragmentů s linkerem 20aa dlouhým bylo nutné ke konstruktu H-20-L připravit i scFv ve formátu L-20-H. Postup sestával z několika kroků: nejprve byl klonován mezi BamHI a EcoRI místa vektoru obsahujícího konec lehkého řetězce, dvě repetice Gly₄Ser a celý těžký řetězec M75 (ten z takto otevřeného vektoru vypadl) níže uvedený oligonukleotidový duplex kódující jeden gly-ser motiv (navržený tak, aby po klonování do BamHI místa, toto místo zrušil, a zároveň přinášející BamHI posunuté na konec tohoto motivu a EcoRI místo, oddělené od BamHI místa několika nukleotidy pro snazší klonování mezi tato dvě místa v následném kroku).

```

                    BamHI      EcoRI
5'  GA TCG GGC GGT GGC GGA TCC xxx G      3'
3'           C CCG CCA CCG CCT AGG yyy CTT AA 5'

```

Produkt ligace (viz schéma) tedy obsahuje:

```

                    XhoI                                     BamHI      EcoRI
* * * CTC GAG ATC AAA CGT GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGT GGC GGA TCG GGC GGT GGC GGA TCC xxx G * * *
* * * Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser * * *

```

BamHI místo umístěné tak, aby mezi ně a EcoRI mohl být vnesen celý těžký řetězec M75 včetně předřazeného jednoho Gly₄Ser motivu, čímž se dosáhne celkového uspořádání (Gly₄Ser)₄, tzn. linkeru o délce 20 aa zbytků. Tento meziproduct poskytl insert XhoI-EcoRI (obsahující konec lehkého řetězce, 20aa linker a celý těžký řetězec, včetně myc úseku a histidinové kotvy), a v posledním kroku se jím vyměnila odpovídající oblast v plasmidu kódujícím scFv M75 ve formátu L-15aa-H.

4.2.1.10 Příprava fragmentu M75 ve formátu intrabody

Konstrukce proběhla v několika krocích:

(i) pomocí dvou reakcí PCR byly připraveny fragmenty, ab a cd (viz obr. 21, panel A). U fragmentu ab byl k amplifikaci s párem primerů a a b použit jako templát plasmid p589, který obsahuje signální peptid (leader) včetně Kozakové sekvence. U fragmentu cd byl templátem plasmid p708 (obsahující scFv M75 v orientaci H-20-L) a jako primery byly použity c a d, přičemž c je komplementární k b, použitému v syntéze fragmentu ab.

Ve schématech níže, jsou použité primery vyznačeny modře:

1. reakce a / b na templátu p589

```

                                HindIII           M   D   W   I   W   R   I   L   F   L
V
CG GCC AGT GCC AAG CTT TCC ACC ATG GAT TGG ATT TGG AGG ATC CTC TTC TTG
GTG
GC CGG TCA CGG TTC GAA AGG TGG TAC CTA ACC TAA ACC TCC TAG GAG AAG AAC
CAC

  G   A   A   T   G   A   H   S   d   i   v   m   t
GGA GCA GCG ACA GGT GCC CAC TCC Gat atc gtg atg aca ... ..
CCT CGT CGC TGT CCA CGG GTG AGG C
                                TT CAC GTC CAA CAC 5'
                                E   V   Q   V   V

```

produkovala fragment ab o velikosti 95 bp, který obsahuje klonovací HindIII místo, Kozakové sekvenci ACCATGG, leader a prvních pět zbytků těžkého řetězce M75 (EVQVV).

2. reakce c / d (c je komplementární k b z 1. reakce) na templátu p708

```

  A   T   G   A   H   S   E   V   Q   V   V   E   S   G   G   G   L
V   Q
GCG ACA GGT GCC CAC TCC GAA GTG CAG GTT GTG GAG TCT GGT GGA GGA TTG
GTG CAG
                                CTT CAC GTC CAA CAC CTC AGA CCA CCT CCT AAC
CAC GTC

CCT AAA GGG TCA TTG AAA CTC TCA TGT GTA GTC TCC GGA AGC ACC CTC AAT
AAT TAC

GCC ATG AAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTG GAA TGG GTT GCT
CGC ATA

AGA AGT AAA AGT AAT AAT TAT GCA ACA TAT TAT GCC GAT TCA GTG AAA GAC
AGG TTT

ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCA CAA AGC ATG ATC TAT CTG CAA ATG AAC AAC
TTG AAA

ACT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT GTG ACC TAT GGT AAT CAC CCT TTT
GCT TAC

TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC GGA GGT GGC GGT TCA GGC GGT
GGC GGA

  S   G   G   G   G   S   G   G   G   G   S   D   I   V   M   T   Q
S   P
TCC GGC GGT GGC GGA TCC GGC GGT GGC GGA TCG GAT ATC GTG ATG ACA CAG
TCT CCA
AGG CCG CCA CCG CCT AGG CCG CCA CCG CCT AGC CTA TAG CAC TAC TGT GTC
AGA GGT

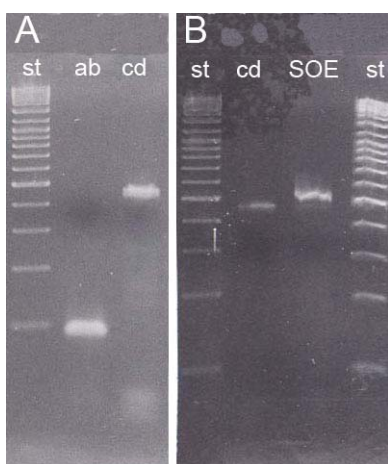
                                EcoRV

  L   S
CTC TCC
GAG AGG

```

produkovala fragment cd o velikost 462 bp, který se na 5' překrývá s 3' koncem produktu první reakce ab díky překryvu komplementárních c a b primerů a pokračuje přes celý těžký řetězec, čtyři repetice GlySer linkeru až do začátku lehkého řetězce.

(ii) ve třetí PCR reakci, tzv. SOE= Splicing by Overlap Extension, s primery a a d byla templátem směs produktů ab a cd z předchozích dvou reakcí, které po denuraci a „annealingu“ se překrývají v části c/b a při použití krajních primerů a a d jsou extendovány do konečné podoby 524 bp dlouhého duplexu označeného SOE (obr. 21, panel B), který obsahuje ve fragmentu HindIII-EcoRV iniciační ATG v Kozakové kontextu, leader, těžký řetězec, 20aa linker a začátek lehkého řetězce (první dvě aminokyseliny, DI).



Obrázek 21: PCR produkty při konstrukci intrabody formy scFv M75. Panel A, fragmenty ab a cd; Panel B, fragment SOE v porovnání s cd.

V dalším postupu byl do plasmidu pro M75 H-20-L (v pUC18) zaklonován výše popsáný HindIII-EcoRV fragment (po ověření sekvence), v produktu pak byla za myc tagem na 3'-konci, mezi Asp718I – EcoRI, odstraněna histidinová kotva a na její místo vpraven oligonukleotidový duplex kódující retenční signál KDEL a Stop kodon.

```

      Asp718I                                     EcoRI
      Gly Thr Ala Ala S E K D E L ***
5' - GT ACC GCC GCA AGC GAG AAG GAC GAG CTC TG
      G CGG CGT TCG CTC TTC CTG CTC GAG AC TTAA -5'

```

V posledním kroku pak byl celý výše popsáný insert HindIII-EcoRI, kódující scFv M75 opatřený signály pro směrování a zachycení produktu v endoplasmatickém retikulu, vnesen do vektoru pcDNA3 pro expresi v savčích buňkách.

4.2.1.11 Konstrukce „kamelidu“ M75

V plasmidu kódujícím scFv M75 v L-H orientaci byla oblast mezi NcoI místem a BstEII (zahrnující lehký řetězec, linker a velkou část těžkého řetězce) nahrazena fragmentem NcoI-BstEII z plasmidu kódujícího scFv M75 v orientaci H-L, čímž bylo dosaženo uspořádání.

NdeI | *pelB* | *NcoI* EVQ těžký řetězec *BstEII* VSS_{myc} Asp718I HIS₅ *EcoRI*

Tento plasmid tedy kóduje expresi samotného variabilního těžkého řetězce M75, opatřeného na C-konci sekvencí myc a histidinovou kotvou.

4.2.2 Transformace, transfekce

Při transformaci kompetentních buněk *E.coli* (kmen BL21(DE3) nebo DH5α) bylo smícháno 100 μl bakteriální suspenze s 1 μl plasmidu, postupně inkubováno 30 min v ledu, 45 s při 42 °C a 2 min v ledu. Následně bylo přidáno 900 μl LB média a třepáno (150 ot./min) 1 hod při 37 °C. Pak byla bakteriální suspenze ve vhodném ředění rozetřena na LB agarových plotnách obsahujících ampicilin (100 μg/ml) a ponechána přes noc při 37 °C.

Pro stabilní transfekci S2 buněk bylo smícháno 36 μl 2M CaCl₂, 25 μl plasmidu pMT/BiP/V5His s genem pro scFv, 1 μl plasmidu pCoBLAST, 248 μl tkáňové vody, a za stálého míchání byla tato směs překapána do 300 μl 2 x koncentrovaného HEPES Buffer Saline (HBS), inkubováno 30 min při laboratorní teplotě a přidáno na misku (průměr 35 mm) s S2 buňkami (asi 7,5x10⁶) a inkubováno 16 hodin při 22 °C. Poté byly buňky převedeny do čerstvého kompletního média a dále pěstovány při 22 °C dva dny. Následně byly buňky přeneseny do kompletního média média SF900II obsahujícího 5 μg /ml blasticidinu a selektovány po dobu 4 až 5 týdnů (viz návod výrobce *Drosophila* Expression System Version C, Invitrogene 2005). Vyselektované buňky, u nichž byla ověřena produkce scFv byly zamrazeny s 10% DMSO a skladovány v tekutém dusíku.

4.2.3 Rekombinantní exprese v *Escherichia coli*

4.2.3.1 Exprese scFv do cytoplasmy, izolace inkluzních tělísek

Buněčná kultura *E. coli* BL21(DE3) byla transformována expresním plazmidem T7Q10 nesoucím příslušný gen a pěstována v 500 ml média (viz Buňky, vektory, média) ve 2 l Erlenmayerových baňkách v rotačním inkubátoru Sanyo při 37 °C a 250 ot/min. Růst bakteriální kultury byl sledován při 550 nm. Po dosažení optické hustoty (OD_{550nm}) 1,5 byla exprese indukována přidáním IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) do finální koncentrace 1 mM. Po indukci byla bakteriální kultura pěstována dalších 3-5 hodin (v závislosti na rychlosti růstu OD_{550nm}). Tvorba inkluzních tělísek obsahujících produkt exprese byla sledována za použití fázové kontrastní mikroskopie (174). Buňky byly sklizeny centrifugací (5000 ot/min, 25 min., 4 °C, Sorvall Instrument RC-3B, rotor H 300), omyty v PBS a zamraženy při -25 °C (27).

Zamražené buňky byly velmi pečlivě homogenizovány v PBS s 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoridem (PMSF). Následně byly buňky suspenze podrobeny desintegraci na přístroji French Pressure Cell Press (ThermoSpectronic) při tlaku 2000 Psi (pounds per square inch), což je přibližně 13,8 MPa.

Stejným způsobem bylo postupováno i v případě, kdy produkt směřovaný do periplasmatického prostoru v něm nezůstával rozpustný, nýbrž vytvářel inkluze.

V alternativním postupu (27, 175) bylo desintegrace buněk dosaženo několikerým zamražením a rozmražením v lyzačním pufru (50 mM Tris pH 8,0; 50 mM chlorid sodný; 5 mM EDTA a 0,1 mM PMSF), inkubací s 1% (w/v) lysozymem a 0,05% (w/v) deoxycholátem sodným a následnou sonikací (Soniprep 150, MSE; po 20 ml množstvích, 20 s intervaly, za chlazení v ledové lázni). Inkluze byly izolovány centrifugací (rotor Beckman JA-14, 20 min, 12000 ot/min, 4 °C) a postupně promyty pufrů (10 ml/1g buněk): A (50 mM Tris pH 8,0; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA), B (pufr A s 1 M NaCl), C (pufr A s 1% (v/v) Triton X100), A. Mezi mytím jednotlivými pufrů byly inkluze centrifugovány jak uvedeno výše.

4.2.3.2 Renaturace scFv z cytoplasmatických inkluzí

Renaturace proteinů z cytoplasmatických inkluzí vyžaduje pro každý protein optimalizaci. Bylo testováno a upraveno několik postupů publikovaných pro scFv produkované v *E. coli* BL21(DE3) ve formě cytoplasmatických inkluzí. Základem jsou dva upravené postupy.

V postupu převzatém z Kurucz et al. (176) byla inkluzní tělíska (0,5g) rozpuštěna v 15 ml pufru o složení 50 mM Tris-HCl pH 8,0 s 2 % N-lauryl sarkosyl sodným (SLS, Sigma). Roztok byl velmi silně míchán přes noc při laboratorní teplotě s 50 μ M CuSO₄, aby došlo k oxidaci -SH skupin pomocí vzdušného O₂. Následně byla přidána močovina (Sigma) do finální koncentrace 6 M a SLS byl odstraněn pomocí anexu Dowex (Sigma). Močovina byla odstraněna dialýzou proti renaturačnímu pufru (10 mM borát pH 8,5), vhodnému pro následnou chromatografii (viz kap. 4.2.7).

V alternativním postupu odvozeném z prací (177, 178) bylo 0,25 g inkluzí rozpuštěno v 25 ml pufru o složení 6 M guanidin hydrochlorid (Fluka); 50 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; 200 mM NaCl a 10 mM 2-merkaptoethanol (2-ME) a necháno za silného míchání přes noc při laboratorní teplotě. Následně byl tento roztok 4x naředěn pufrům: 3 M močovina; 50 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA a 200 mM NaCl a dialyzován 8 hodin při laboratorní teplotě proti 1 l pufru (3 M močovina; 50 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA a 200 mM NaCl). Další dialýzy již probíhaly přes noc při 4 °C proti 1 l pufru stejného složení, s postupně klesající koncentrací močoviny, tedy 2 M, 1 M (zde byl navíc přítomen 400 mM L-Arg, který podporuje správný „folding“ proteinů (179, 180), a 375 μ M oxidovaný glutathion (GSSG, Sigma) jako oxidační činidlo pro oxidaci -SH skupin (181), 0,5 M a nakonec bez močoviny. Obě poslední dialýzy trvaly asi 8 hodin každá. Závěrem následovala dialýza proti 10 mM borátu pH 8,5 pro chromatografii na DEAE-Sepharosu (viz kap. 4.2.7).

4.2.3.3 Exprese scFv do periplasmy, izolace rozpustného scFv

Buněčná kultura *E. coli* BL21(DE3) byla transformována expresním plazmidem pET 22b (+) a pěstována v 500 ml média (viz Buňky, vektory, média) ve 2 l Erlenmayerových baňkách v rotačním inkubátoru při 37 °C a 250 ot/min. Růst bakteriální kultury byl sledován při 550 nm. Po dosažení OD_{550nm} 0,8-1,0 byly baňky přeneseny do předem vychlazeného (20 °C) rotačního inkubátoru (Sanyo) a pěstovány asi 0,5 hodiny, následně bylo přidáno IPTG do finální koncentrace 250 μ M. Po indukci byla bakteriální kultura pěstována při daných podmínkách (20 °C, 250 ot./min.) dalších 3-5 hodin (v závislosti na rychlosti růstu OD_{550nm}). Buňky byly sklizeny centrifugací (5000 ot/min, 25 min., 4 °C, Sorvall Instrument RC-3B, rotor H 300) a suspendovány v „mycím pufru“ (30% sacharosa; 50 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA), přibližně 15 ml pufru na 1g biomasy. Suspenze byla mírně třepána 5 minut při 0 °C. Následně byla suspenze centrifugována 12000 g; 30 min; 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta

suspendována v hypotonickém roztoku (šokovém pufru) (5 mM MgSO₄; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM PMSF), velmi silně třepána (200 ot/min; 50 min.; 0 °C) a opět centrifugována 15000 g; 40 min.; 4 °C. Po centrifugaci byla peleta obsahující sferoplast (většinou i periplasmatické inkluze) zamražena a supernatant uložen při 4 °C pro další zpracování. Uvedený postup vychází z prací (182, 183).

Při testovacích izolacích z malého množství biomasy (cca 1g) se v mycím pufru rekombinantní proteiny nevyskytovaly a pracovalo se pouze s šokovým pufrém. Při izolacích z velkého množství biomasy (30g) se rekombinantní proteiny nacházely v šokovém i mycím pufru, a to ve srovnatelném množství. Dále byly zpracovávány obě frakce společně. Následovala dialýza proti pufru vhodnému pro afinitní chromatografii (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0 ; 300 mM NaCl). Po dialýze byly případné agregáty odstraněny centrifugací (rotor Beckman JA-21, 15000 g, 4 °C, 45 min). Takto upravený vzorek bylo možno použít v afinitní chromatografii na Ni-CAM HC Resin (Sigma) (viz 4.2.6).

V případech, kdy se tvořily inkluze i v periplasmě bylo postupováno při jejich izolaci stejným způsobem jako u inkluzí cytoplasmatických (kap. 4.2.3.1).

4.2.3.4 Renaturace scFv z periplasmatických inkluzí

Postup vycházel z práce Bayly et al.(184). Inkluzní tělíčka byla resuspendována v TBS pufru (na 1 g inkluzí 2 ml pufru) a suspenze byla pomalu přikapána do roztoku 4 M močoviny v TBS pufru (na 1 g inkluzí 150 ml roztoku močoviny). Směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě, poté 2 hodiny při 4 °C a po celou dobu byla míchána na magnetické míchačce. Nerozpuštěné inkluze byly odstraněny centrifugací (Beckman J-21M, rotor JA-14, 12000 rpm, 20 minut, 4 °C) a dál byl použit jen supernatant obsahující denaturované proteiny, zejména scFv.

Postupné renaturace rekombinantního produktu bylo dosaženo dialýzou roztoku proti TBS pufru. Dialýza probíhala po celkovou dobu 60 hodin při teplotě 4 °C a pomalého míchání. Roztok proteinu byl dialyzován vždy proti trojnásobku svého objemu; v průběhu renaturace byl pufr šestkrát vyměněn. Zpočátku výměna dialyzačního pufru probíhala po 6-8 hodinách a interval byl prodlužován až na 14 hodin. Konečný vzorek byl dále purifikován afinitní chromatografií.

4.2.4 Rekombinantní exprese scFv v S2 buňkách

Zmražené buňky byly převedeny do kultury a postupně pěstovány na větším počtu misek až se docílilo množství buněk potřebného k inokulaci kultury ve „spinneru“ (500 ml); po 5ti dnech kultivace, při hustotě $8-12 \times 10^6$ buněk/ml, byla provedena indukce přidávkem CuSO_4 do finální koncentrace 1 mM. Celý postup byl podle protokolu laboratoře doc. J. Konvalinky v ÚOCHB AV ČR, kde nám bylo laskavě umožněno kultivaci provést.

Po dosažení hustoty kultury $21,5 \times 10^6$ buněk/ml byl produkt, nacházející se v médiu, izolován od buněk centrifugací (4500 g; 4 °C; 30 min), médium bylo zamrazeno a skladováno při -70 °C. V dalším zpracování bylo médium s exprimovaným scFv dialyzováno proti pufru (50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0; 300 mM NaCl, případné agregáty byly odstraněny centrifugací (15000 g; 4 °C; 45 min) a preparát dále vyčištěn afinitní chromatografií na Ni-CAM HC Resin (Sigma) (viz kapitola 4.2.6).

4.2.5 Příprava Fab fragmentu proteolytickým štěpením

K 5 mg IgG v 1 ml fosfátovém pufru o pH 7,2 byl přidán 13 mM 2-merkaptoethanol (Sigma), 7 mM EDTA (Lachema) a 2 μg papainu (Sigma). Štěpení při 37 °C bylo sledováno chromatografií odebíraných vzorků na Superdex 200 HR10/30 tak, aby reakce byla včas ukončena a nedošlo k nespecifickému štěpení. Reakce byla zastavena přidáním 5,4 mM jodacetamidu (Koch-Light Laboratories) (185).

4.2.6 Afinitní chromatografie

Většina scFv konstruktů zde uváděných měla His₅- kotvu. Jako první purifikační krok byla v těchto případech použita afinitní chromatografie s náplní Ni-CAM HC Resin (Sigma). Kolonka (10 mm x 60 mm) s Ni-Agarosou byla ekvilibrována v pufru A (50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0; 300 mM NaCl) a pro eluci scFv byl použit pufr A s 50 mM a 250 mM imidazolem. Jelikož imidazol absorbuje při 280 nm, k analýze eluovaných frakcí musela být používána SDS-PAGE. Objem jímaných frakcí odpovídal objemu chromatografického nosiče. Standardně se objem frakcí pohyboval od 5 do 10 ml.

V případě scFv produkovaných v S2 buňkách bylo využito N-glykosylace produktu a dalším purifikačním krokem následujícím po IMAC chromatografií byla afinitní

chromatografie na Lentil Lectin Sepharose 4B (Amersham Biosciences), která váže glykosylované proteiny. ScFv byl dialyzován do PBS pH 7,4 a kolonka (10 mm x 40 mm) s Lentil Lectin Sepharosou byla ekvilibrována ve stejném pufru. Eluce byla provedena PBS s 300 mM methyl- α -D-mannopyranosidem (Sigma).

Při purifikaci Fab fragmentu po proteolytickém štěpení IgG pomocí papainu (viz kap. 4.2.5) byla použita 5 ml kolona Econo-Pac Protein Cartridge (BioRad) ekvilibrována v PBS. V průběhu nanášení vzorku byly jímány frakce s Fab fragmentem (který nosičem protéká).

4.2.7 Ionexová chromatografie

Pro první purifikační krok konstruktů u kterých nebyla připojena His₅-kotva, byla použita matrice diethylaminoethyl sephacel (DEAE – Sephacel, Pharmacia), což je slabý aniontový měnič. Kolona (průměr 55 mm x výška 50 mm) byla ekvilibrována v 10 mM borátu pH 8,5. Eluce byla provedena stejným pufrům s 0,5 M NaCl.

Finálním krokem (pokud nenásledovala chromatografie na Superdex 200) byla chromatografie na koloně Mono Q HR5/5 (Amersham Biosciences). Podle pI proteinu byly použity pufrы s 20 mM Triethanolaminem pH 7,3 pro scFv s nižším pI, a 20 mM diethanolaminem pH 8,4 pro proteiny s vyšším pI. Eluce byla provedena gradientem NaCl v příslušném pufru podle následujícího schématu: 0% – 20% B: 0 – 20 ml; 20% – 100% B: 20 – 30 ml (kde % B vyjadřují zastoupení pufru s 1 M NaCl). Průtok a tlak byly dle doporučení výrobce 1 ml /min a tlak maximálně 5 MPa. Eluční profil byl sledován při 280 nm.

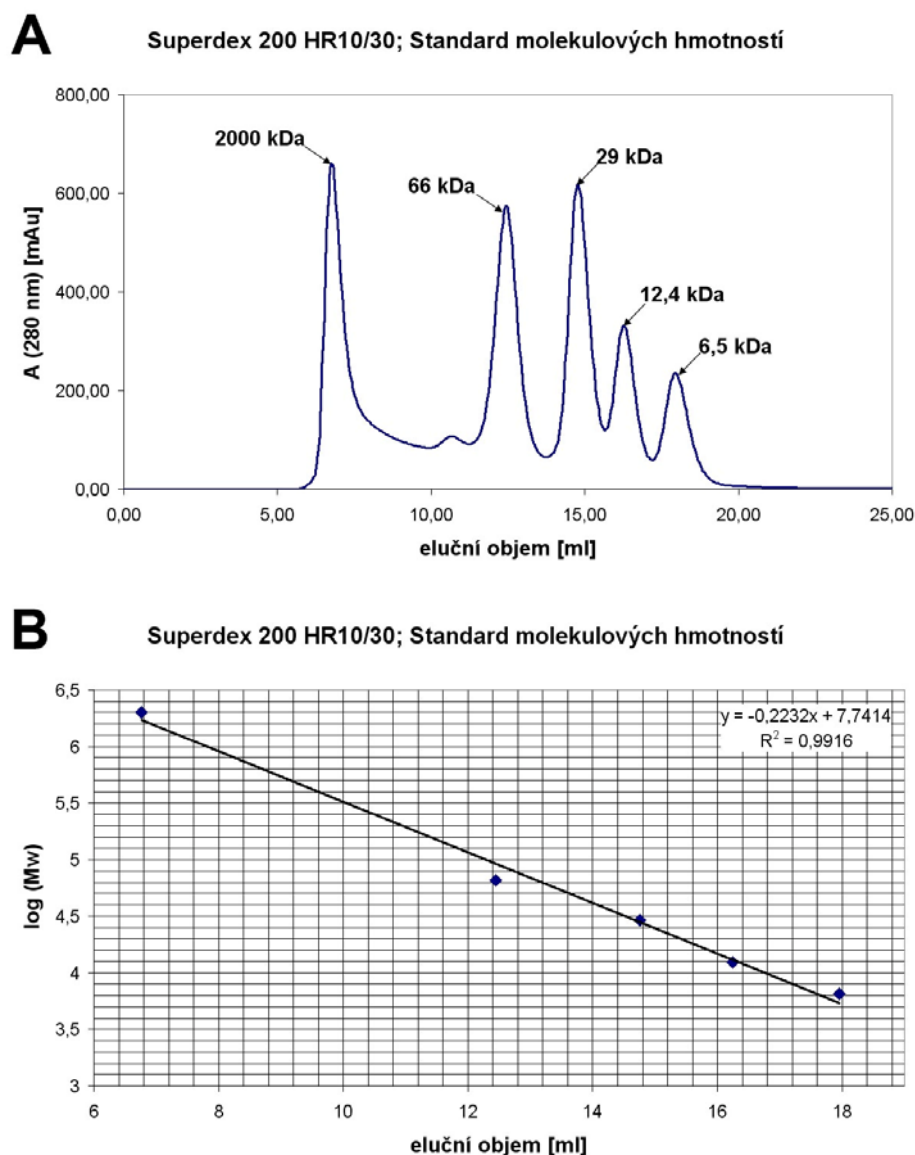
4.2.8 Gelová filtrace

Pro preparativní gelovou filtraci ne zcela čistých preparátů byla použita kolona (27 mm x 723 mm) s náplní Sephadex G75 (Pharmacia). Použité pufrы byly stejné jako v případě Superdex 200 HR10/30 (viz níže).

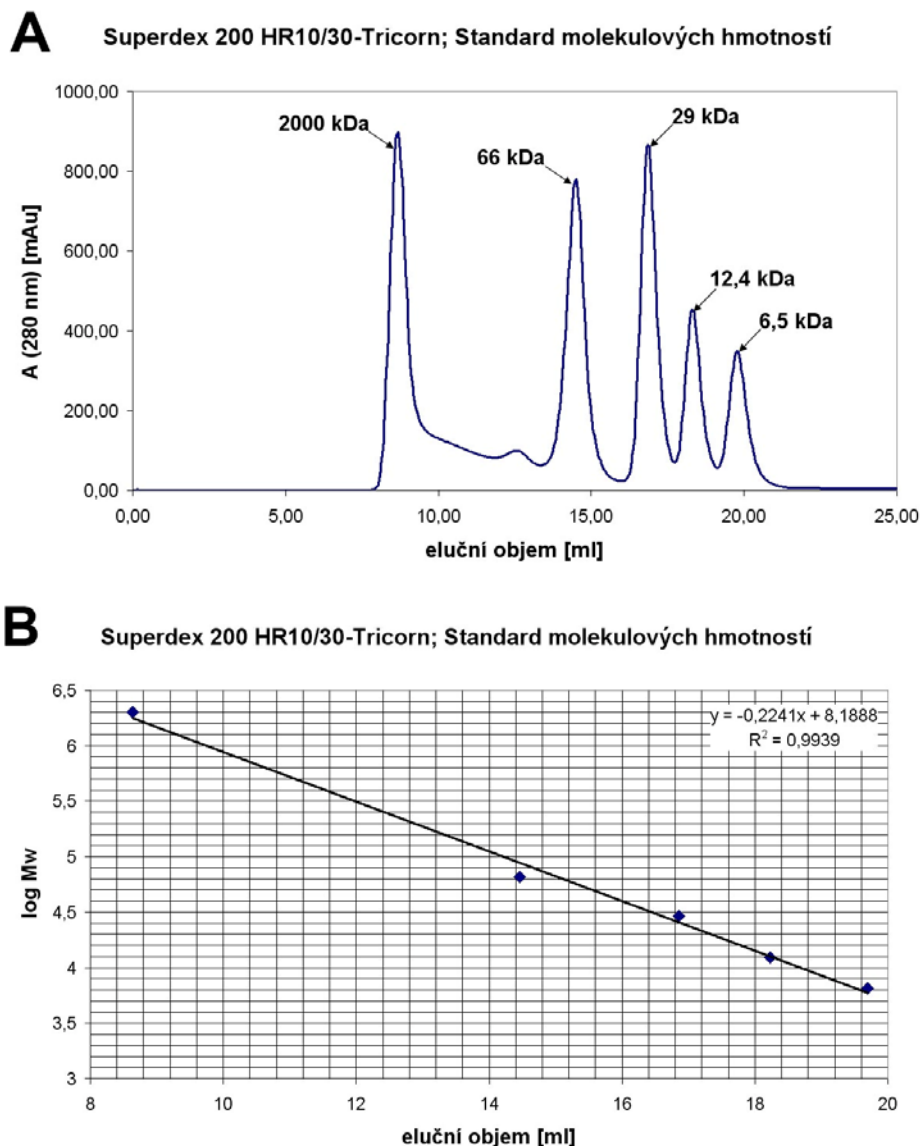
Pro finální purifikační krok a pro analytickou chromatografii všech scFv a Fab fragmentů byla použita kolona Superdex 200 HR10/30 (Amersham Biosciences). Je určena pro dělení proteinů o molekulové hmotnosti 10 – 600 kDa. Průtok a tlak byl použit dle doporučení výrobce (0,5 ml/min; max. 1,5 MPa). Použité pufrы se lišily podle pI hodnot jednotlivých fragmentů. Pro fragmenty s nižším pI byl použit PBS pH 7,4 a

pro fragmenty s vyšším pI pufr o pH 8,4 (20 mM diethanolamin; 100 mM NaCl). Eluce byla sledována při 280 nm.

Dělicí schopnost kolon Superdex 200 HR10/30 (Pharmacia) a Superdex 200 HR10/30 (Amersham Biosciences), které se lišily dobou používání a které byly použity v průběhu experimentů, byla porovnána dělením standardů molekulových hmotností (Fluka).



**Obrázek 22: A) Kalibrace kolony Superdex 200 HR10/30 (Pharmacia) standardy molekulových hmotností Fluka (aprotinin 6 500 Da, cytochrom C 12 400 Da, karboická anhydrasa 29 000 Da, albumin 66 000 Da, dextran blue 2 000 000 Da)
B) Graf pro odečet dekadického logaritmu molekulové hmotnosti v závislosti na elučním objemu pro kolonu Superdex 200 HR10/30 (Pharmacia).**



Obrázek 23: A) Kalibrace kolony Superdex 200 HR10/30-Tricorn (Amersham Biosciences) standardy molekulových hmotností Fluka (aprotinin 6 500 Da, cytochrom C 12 400 Da, karbonická anhydrasa 29 000 Da, albumin 66 000 Da, dextran blue 2 000 000 Da) B) Graf pro odečet dekadického logaritmu molekulové hmotnosti v závislosti na elučním objemu pro kolonu Superdex 200 HR10/30 -Tricorn (Amersham Biosciences).

4.2.9 Elektroforéza proteinů

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) byla prováděna podle Laemmliho (186) na aparatuře Mighty Small II SE 250 (Hofer Scientific Instruments). Deskové gely měly rozměry 80x70 mm a tloušťku 0,75 mm. Dělicí gel obsahoval 12,5% nebo 15% akrylamid a N,N'- bisakrylamid (BIS) v hmotnostním poměru BIS:akrylamid 1:36,5, dále pak 375 mM Tris pH 8.8; 1 mM

EDTA, 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% SDS; 0,1% (v/v) N,N,N',N'- tetramethylendiamin (TEMED) a 0,1 % persíran amonný.

Zaostřovací gel obsahoval 5% akrylamid a BIS ve stejném poměru jako dělicí gel, 125 mM Tris pH 6,8; 1 mM EDTA; 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% SDS; 0,1% TEMED a 0,1% persíran amonný. Elektrodotový pufr měl složení 20 mM Tris pH 8,3; 200 mM glycin a 0,1% SDS.

Vzorky proteinu byly před nanesením na zaostřovací gel smíchány v poměru 2:1 se vzorkovým puforem o složení 125 mM Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 10% (v/v) 2-merkaptoetanol; 4% SDS; 0,2% bromfenolová modř a povařeny 2-5 minut na vodní lázni. Vzorky po afinitní chromatografii (IMAC), obsahující imidazol, byly inkubovány 60 minut při 37 °C.

Elektroforéza byla prováděna za laboratorní teploty. Standardně bylo použito konstantní napětí pro zaostřovací gel 90 V a pro dělicí gel 150 V, případně byl použit výkon 3 W/gel, při proměnném elektrickém napětí a proudu. Při vyšší koncentraci proteinu (asi 0,5 mg/ml) byly gely barveny Coomassie Brilliant Blue R-250 (187), jinak stříbrem (188).

Jako standard molekulových hmotností byla používána směs proteinů Broad Range (BioRad), obsahující proteiny: Myosin (200 kDa), β -Galaktosidasa (116,3 kDa), Fosforylasa b (97,4 kDa), Sérum Albumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Karbonická anhydrasa (31 kDa), Trypsinový inhibitor (21,5 kDa), Lysozym (14,4 kDa), Aprotinin (6,5 kDa).

4.2.10 Izoelektrická fokusace

Pro potvrzení teoretického izoelektrického bodu (pI) jednotlivých proteinů, získaného pomocí programu ProtParam v databazi SwissProt, byl použit Pharmacia Phast System s komerčně dodanými gely s gradientem pH. Barvení gelů bylo obdobné, jako je popsáno v kapitole 4.2.12.

4.2.11 Western Blot (elektropřenos proteinů na membránu)

Specifické detekce proteinů protilátkami po jejich přenosu na nitrocelulósovou membranu (Amersham) (189) bylo využito k ověření identity a aktivity scFv.

Elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulóзовou membránu byl prováděn za laboratorní teploty na přístroji společnosti Hoefer Scientific Instruments v elektrodoovém pufru o složení 20 mM Tris pH 8,3; 200 mM glycin; 0,1% SDS a 20% (v/v) methanol. Byl použit konstantní elektrický proud o síle 1 mA/cm² membrány po dobu 1,5 hodiny.

Vazebná místa na nitrocelulóзовé membráně byla saturována 5% roztokem odtučněného mléka v PBS a poté byla membrána inkubována 1,5 hodiny se specifickou primární protilátkou či jejím scFv fragmentem (koncentrace se lišily podle typu protilátky či scFv od 5 nM do 0,5 μM).

Po opláchnutí v PBS byla membrána inkubována 1 hodinu se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou a poté byla membrána opět opláchnuta v PBS. Jako sekundární protilátky byly použity králičí polyklonální protilátka RAM/hPx (SigmaAldrich) nebo monoklonální protilátka proti c-myc, anti-c-myc/hPx klon 9E10 (Roche). Obě v koncentraci okolo 7 nM. Protilátky byly ředěny v roztoku 5% mléka v PBS. Proteiny specificky rozpoznávané primární protilátkou byly vizualizovány přidáním chromogenního substrátu peroxidázy: 10 ml PBS; 2 ml roztoku 4-chloro-1-naftolu v metanolu (připraveného rozpuštěním 1 tablety (SigmaAldrich) ve 100 ml metanolu) a 15 μl 33% (v/v) H₂O₂; pro citlivější detekci byl jako substrát použit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) a pořízena fotografie na Medical X-ray Film (Foma Bohemia).

V případě testování úspěšnosti exprese rekombinantních scFv fragmentů (obsahujících ve své sekvenci c-myc epitop) bylo taktéž využito metody Western Blot s tím rozdílem, že monoklonální protilátka (mAb) anti-c-myc/hPx klon 9E10 (Roche) byla použita jako primární protilátka na zjištění přítomnosti daných fragmentů v hrubém buněčném extraktu či v médiu.

4.2.12 ELISA

Roztok antigenu o vhodné koncentraci ve vhodném pufru (PBS pH 7,4 nebo karbonátový pufr pH 9,6) byl nanesen na 96-jamkovou destičku PolySorp (Nunc) a inkubován 60 minut při laboratorní teplotě, pak byla destička důkladně omyta PBS. Jako antigen byly použity karbonická anhydrasa IX pro protilátku M 75 (190) a BSA (bovinní sérový albumin) konjugovaný s epitopovým peptidem pro TU-20 (191) (konjugace byla provedena pomocí soupravy Inject Maleinimide Activated BSA Kit,

Pierce). Po saturaci roztokem 1% BSA v PBS byla destička inkubována 1,5 hod s primární protilátkou v 1% BSA v PBS, omyta roztokem PBS a dále inkubována 1 hod se sekundární protilátkou v 1% BSA v PBS (pro rekombinantní scFv fragmenty, anti-c-myc/hPx, klon 9E10 (Roche); pro IgG či Fab fragment, polyklonální králičí RAM/hPx (Sigma)). Destička byla opět promyta PBS a byl přidán substrát pro křenovou peroxidasu (hPx): 5 ml citrátového pufru pH 5,0; 15 μ l 33% (v/v) H_2O_2 a jedna tableta (2 mg) o-fenyldiaminu (OPD) (Sigma). Reakce byla zastavena přidáním stejného 1 M H_2SO_4 . Absorbance byla měřena při 492 nm na přístroji ELISA Reader Infinite 200 (Tecan). Vyhodnocení bylo provedeno programem Magellan 6.0 (Tecan).

Kompetitivní ELISA pro porovnání vazebné aktivity scFv M75 a Fab M75. Oba fragmenty naředěné v 1% BSA v PBS byly smíchány tak, že při konstantní koncentraci scFv fragmentu (86 nM) byla postupně zvyšována koncentrace Fab fragmentu (8,6 nM-1,103 μ M) a naopak, při konstantní koncentraci Fab fragmentu (91 nM) byla zvyšována koncentrace scFv fragmentu (17,9 nM-11,03 μ M). Takto smíchané fragmenty byly inkubovány 16 hod při 4 °C a následně byly jednotlivé směsi aplikovány na mikrotitrační destičku s antigenem CA IX (7 nM). Jako sekundární protilátka byla použita pouze anti-c-myc/hPx.

ELISA na živých buňkách. Buňky HT29 (CA IX⁺) a Vero (CA IX⁻) byly pěstovány 3 dny při teplotě 37 °C a 5% CO_2 na 24-jamkové destičce Nuclon Delta (Nunc). Po mikroskopické kontrole hustoty buněk, byly buňky omyty 2% fetálním sérem v PBS a na každou jamku bylo aplikováno 100 μ l primární protilátky (scFv M75 nebo IgG M75) ředěné 2% fetálním sérem a necháno inkubovat 1 hod/25 °C/100 ot/min. Následně byly jamky omyty 2% fetálním sérem v PBS a bylo přidáno 100 μ l sekundární protilátky (viz text výše) ředěné v 2% fetálním séru v PBS a inkubováno 30 min při 25 °C. Jamky pak byly 2 x omyty 2% fetálním sérem v PBS a bylo přidáno na jamku 100 μ l roztoku substrátu pro křenovou peroxidasu (5 ml citrátového pufru pH 5,0; 2 mg OPD; 10-20 μ l 30 % H_2O_2) a ponecháno 30 min ve tmě reagovat. Následně bylo z každé jamky přeneseno 50 μ l do 96-jamkové mikrotitrační destičky a přidáno 50 μ l 1 M roztoku H_2SO_4 na zastavení reakce. Absorbance byla měřena na přístroji ELISA Reader (SLT Labinstrument) při 492 nm.

4.2.13 ITC & DSC

ITC (isothermal titration calorimetry): metoda byla použita pro charakterizaci vazby scFv M75-epitopový peptid K (DLPGEEDLPGEE) (190). Koncentrace scFv M75 ve vzorkové cele se v jednotlivých experimentech pohybovala od 7 do 12 μM a koncentrace peptidu K v automatické byretě byla 11 až 15ti násobně vyšší. Přidávky z byrety do cely byly od 5 do 9 μl . Měření byla provedena ve třech různých pufrch s tabelovanými hodnotami ΔH_{ion} pro určení skutečné ΔH . Jednotlivé pufrы obsahovaly vždy 20 mM pufráční složku o pH 8,4 (Tricine (Sigma) nebo Triethanolamine (Sigma) nebo Tris (Fluka)) a 100 mM NaCl. K sadě měření provedených v příslušných pufrch při 24 °C bylo provedeno i jedno měření ve vybraném pufru při teplotě 15 °C, kvůli určení ΔC_p .

DSC (differential scanning calorimetry): metodou byl testován vliv vazby ligandu na teplotní stabilitu příslušného scFv a teplotní stabilita samotného scFv. Měření byla provedena v pufru o složení: 20 mM Tris pH 8,4; 100 mM NaCl. Při měření samotného scFv byla koncentrace 14,5 μM , při měření s peptidem K byla koncentrace scFv 24,8 μM a koncentrace peptidu 62 μM (koncentrace peptidu byla vyšší k zajištění dostatečného nadbytku ligandu a nasycení všech vazebných míst; koncentrace 2,5x vyšší se zdála být vhodná vzhledem ke K_a získané v ITC experimentech). Rozmezí testovaných teplot bylo od 5 °C do 100 °C a rychlost změny teploty v čase byla 1 °C/min.

Veškerá měření byla provedena na VP-ITC a VP-DSC firmy MicroCal na Ústavu organické chemie a biochemie za vydatné pomoci dr. Milana Kožíška. Termodynamické parametry, asociační konstanta K_a a stechiometrie reakce byly vypočteny v programu Origin 7.0 (MicroCal, Inc.).

4.2.14 Průtoková fluorescenční cytometrie (FACS-Fluorescent Activated Cell Sorting)

Tato metoda byla použita pro ověření aktivity rekombinantních fragmentů odvozených od mAb MEM97 a jednoho scFv fragmentu M75.

Pokusy byly provedeny podle standardního protokolu. Do mikrotitrační destičky byla nanášena suspenze 2×10^5 - 1×10^6 buněk (pro scFv a IgG MEM97 buněčná linie RAMOS či lidské B lymfocyty z periferní krve nesoucí na povrchu CD20; pro scFv a IgG M75 buňky HT29 nesoucí na povrchu CA IX) a po krátké centrifugaci byla

destička omyta studeným PBS, byla přidána primární protilátka v koncentraci 1,75 μM -17,5 μM a buňky s protilátkou byly inkubovány 30 minut. Destička byla opět omyta v PBS a následně inkubována 30 minut se sekundární protilátkou (anti-c-myc/FITC klon 9E10 (Exbio) pro scFv fragmenty a polyklonální anti-IgG RAM/FITC pro celé imunoglobuliny MEM97 nebo M75), která byla označena fluorescenční značkou fluorescein-isothiokyanátem (FITC). Po promytí byly buňky z destičky uvolněny suspendováním v PBS s propidium jodidem.

Měření byla provedena na přístroji BD FACS Canto (BD Biosciences) ve firmě Exbio (pod vedením dr. Jana Rajnocha) nebo v oddělení prof. Hořejšího na přístroji LSRII (BD Biosciences) (pod vedením dr. Ondřeje Horvátha).

4.2.15 Měření fluorescence

Pro měření vazebné aktivity rekombinantního fragmentu p768 odvozeného od mAb M75 bylo použito kompetitivního měření fluorescence mezi peptidem K (DLPGEEDLPGEE) (190) a peptidem K konjugovaným s fluorescenční značkou dansyl chlorid (DNSCl) (Fluka).

Značení bylo provedeno následujícím způsobem: Peptid K byl rozpuštěn v 100 mM borátovém pufru pH 8,5 do finální koncentrace 1 mM a za stálého míchání byl přidán DNSCl v acetonu do finální koncentrace 10 mM a roztok byl ponechán 1,5-2 hod při laboratorní teplotě. Při reakci došlo ke konjugaci N-koncové amino-skupiny aspartátu se sulfonfylchloridovou skupinou na DNSCl a následně byla reakční směs obsahující konjugovaný a volný peptid a volný DNSCl rozdělena na koloně C-18 Vydac v gradientu acetonitrilu při sledování absorbance při 220 nm (192).

Proměřením absorpčního a emisního spektra (spektrofluorometr Aminco Series 2; Thermospectronic) peptidu K s DNSCl byly změřeny hodnoty vlnových délek, při kterých je excitace a emise nejvyšší. Vlnová délka, při které je nejvyšší excitace a emise DNSCl značky na peptidu K, je 342 nm respektive 553 nm. Dansylovaný peptid K byl následně použit pro měření vazebné aktivity fragmentu p768.

Samotné měření fluorescence bylo provedeno v PBS pH 7,4 a teplotě 25 °C podle následujícího schématu: bylo smícháno 900 μl pufru PBS pH 7,4 se 100 μl peptidu K s DNSCl a 200 μl rekombinantního fragmentu, následně byly pipetovány 1 μl přídavky peptidu K a byla sledována změna fluorescence. Kromě testovaného vzorku p768 byl použit referenční rekombinantní fragment p709 od téže mAb (pozitivní

kontrola) a rekombinantní fragment p643 odvozený od mAb TU-20, jako irelevantní rekombinantní protilátka (negativní kontrola).

4.2.16 Analýza glykosylace

Přítomnost N-glykosylace na scFv fragmentech exprimovaných v S2 buňkách byla ověřena vazbou na Lentil Lectin Sepharose 4B (Amersham Biosciences) jak je uvedeno v kap. 4.2.6 a použitím enzymu PNGase F (New England Biolab), který odštěpuje oligosacharidové zbytky vázané N-glykosidovou vazbou k proteinu či peptidu (193). Postup pro použití PNGase F byl následující: 45 µl scFv MEM97 p768 (cca 1 mg/ml) v PBS smícháno s 5 µl 10 x koncentrovaného denaturačního pufru a 10 minut inkubováno při 100 °C. Následně ochlazeno na 20 °C a přidáno 6,2 µl 10x koncentrovaného G7 reakčního pufru; 6,2 µl 10% roztoku NP-40; 0,62 µl PNGase F (500 U/µl) a ponecháno inkubovat 2 hodiny při 37 °C (upravený postup od výrobce). Následně byla provedena SDS-PAGE na 14% gelu, která odhalila pokles velikosti mezi glykosylovaným a deglykosylovaným scFv MEM97 p768.

5 Výsledky a diskuse

Těžiště předkládané disertační práce spočívá v zavedení kompletní technologie přípravy rekombinantních fragmentů protilátek. Jak již bylo řečeno v Úvodu, jde o ve světě velmi slibně se rozvíjející technologii, která začíná nacházet výrazné uplatnění ve farmaceutickém průmyslu a cílem práce proto bylo zachytit tento nástup v národním měřítku. V práci bylo použito několik monoklonálních protilátek (mAb MEM97; mAb TU-20; mAb M75; mAb F11.2.32), potenciálně využitelných jako diagnostika, popřípadě terapeutika (v dlouhodobějším časovém horizontu). Jednotlivé hybridomové linie (MEM97, M75 a TU-20) pocházejí z různých laboratoří Ústavu molekulární genetiky: monoklonální protilátka TU-20 od dr. Pavla Drábera, MEM97 od prof. V. Hořejšího, M75 od dr. J. Závady. Hybridomovou linii produkující mAb F11.2.32 byla laskavě poskytnuta prof. G. Bentleyem (Pasteurův ústav, Paříž).

Od každé z těchto čtyř monoklonálních protilátek bylo připraveno několik typů rekombinantních fragmentů, které budou detailněji popsány níže, v kapitolách věnovaných jednotlivým protilátkám. U některých z nich budou uvedeny výsledky testování aktivity pomocí FACS analýzy (v případě MEM-97, M75) nebo výsledky fyzikálně chemické charakterizace (v případě M75). Kapitolám věnovaným konkrétním protilátkám bude předcházet několik společných úvodních statí pojednávajících obecně o konstrukci fragmentů a jejich expresi, o způsobech analýzy produktů exprese a vlivu délky linkeru mezi variabilními doménami na multimerizaci scFv fragmentů. Tyto obecné pasáže budou obsahovat eventuální odkazy na ilustrující příklady v navazujících kapitolách věnovaných konkrétním protilátkám.

5.1 Konstrukce rekombinantních fragmentů protilátek

Nejmenší fragment protilátky, který si ještě zachovává vazebnou aktivitu je tzv. Fv fragment, tedy fragment obsahující variabilní domény obou řetězců, těžkého a lehkého, které jsou vzájemně svázané nekovalentními interakcemi a spoluvytvářejí vazebné místo pro antigen. Jsou-li obě domény kovalentně spojeny flexibilním peptidovým linkerem, hovoříme o scFv fragmentech (single-chain Fv fragment).

Vlastní konstrukce scFv fragmentů, od izolace celkové RNA z hybridomových buněk, přes přípravu cDNA molekul kódujících variabilní domény těžkého a lehkého

řetězce (pomocí RT-PCR techniky), až po sestavení finálních scFv molekul, je podrobně popsána v Metodách (kapitola 4.2.1 Molekulární klonování – konstrukce scFv fragmentů).

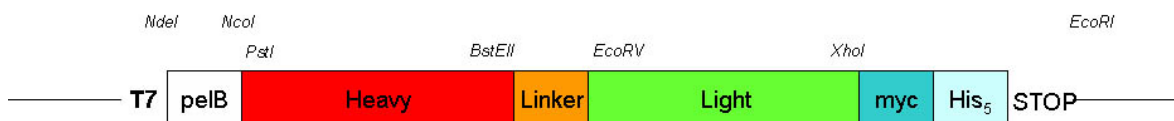
Všechny scFv fragmenty, pro M75, TU-20, MEM97 i F11.2.32 obsahují na C-konci c-myc epitop o aminokyselinové sekvenci EQKLISEEDL, který slouží pro detekci rekombinantních fragmentů pomocí anti-myc protilátky. Fragmenty produkované do periplasmatického prostoru hostitelských bakterií navíc obsahují za c-myc epitopem ještě sekvenci pěti aminokyselinových zbytků histidinu, umožňujících purifikaci pomocí IMAC na Ni-agarose. Směrování vznikajícího polypeptidu do periplasmy zajišťuje tzv. signální sekvence přítomná na N-konci fragmentů, v našem případě pelB leader (MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA), který je součástí komerčně dostupného expresního vektoru pET-22(b). Při transportu vznikajícího proteinu přes plasmatickou membránu dochází k odštěpení signálního peptidu a v periplasmatickém prostoru se akumuluje produkt exprese již řádně složený, ve správné aktivní konformaci, včetně obou intramolekulových disulfidových můstků typických pro variabilní domény protilátek (103). Relevantní část vektoru je ukázána na schématu níže a jak je patrné, v konstruktech lze podle potřeby snadno vyměňovat DNA fragmenty kódující různé scFv molekuly (např. jako inserty NcoI-EcoRI nebo EcoRV-BstEII), měnit délku linkeru a podobně. Z praktického hlediska bylo výhodné provádět většinu konstrukcí a subklonování v jednodušších vektorech typu pUC nebo pBluescript, neboť samotné plasmidy pET série již obsahují některá používaná restrikční místa (např. EcoRV nebo BstEII). Jelikož úplný insert scFv nese vlastní histidinovou kotvu a Stop kodon, bylo ve vektoru pET-22(b) žádoucí odstranit totožné sekvence nacházející se 3' od EcoRI místa (viz Metody, kap. 4.2.1.6).



Obrázek 24: Schéma genu pro produkci scFv fragmentů do periplasmy v orientaci V_L-linker-V_H.

Obecně se uvádí, že u scFv fragmentů nezáleží na vzájemné orientaci domén, L-H a H-L fragmenty se zpravidla chovají stejně. Jak však bude detailněji popsáno pro protilátku M75 (kap. 5.7.2), toto nemusí platit bezvýhradně. Zde se omezíme jen na konstatování, že bylo nutné připravit nově scFv modul, umožňující postupné sestavování scFv fragmentů i v orientaci H-L. Konstrukce vyžadovala postupné vnesení

tří oligonukleotidových duplexů, jak je podrobněji popsáno v Metodách (kap. 4.2.1.7) a výsledný vektor (viz schéma níže) opět umožňuje další manipulace, např. změny délky linkeru nebo vnášení scFv fragmentů odvozených z jiných protilátek.



Obrázek 25: Schéma genu pro produkci scFv fragmentů do periplasmy v orientaci V_H-linker-V_L.

Jak již bylo řečeno, těžké a lehké variabilní domény jednotlivých scFv molekul jsou spojeny pomocí flexibilního linkeru, nejčastěji o aminokyselinové sekvenci (Gly₄Ser)_x, kde x může nabývat hodnot 1 až 4. Délka linkeru ovlivňuje do jaké míry budou scFv fragmenty nabývat i multimerní formy (kap. 5.6). Na schématu uvedeném v Metodách (kap. 4.2.3.8) je zobrazen detail oblasti linkeru (Gly₄Ser)₃ v obou orientacích, H-L a L-H, i se sousedícími nejbližšími restričními místy v těžkém, resp. lehkém řetězci. Pomocí těchto míst byla délka linkeru obměňována vkládáním (výměnou) vhodných oligonukleotidových duplexů.

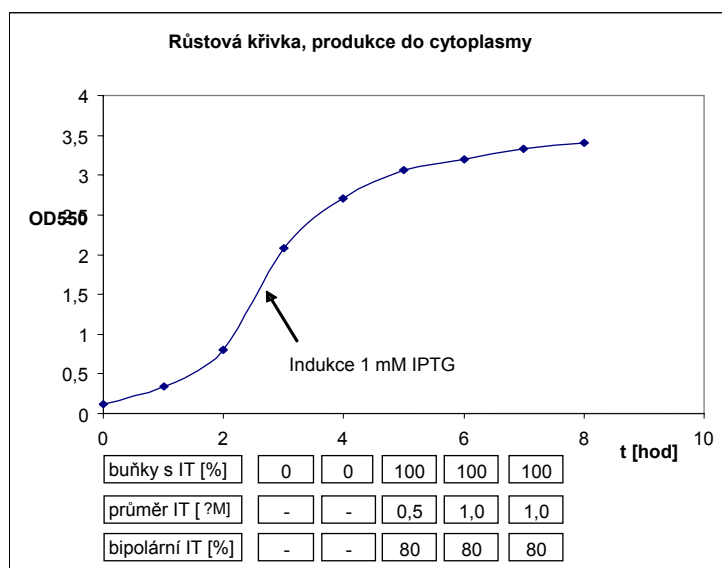
Fragmenty scFv se zkráceným linkerem vytvářejí dimery (či vyšší multimery), neboť při linkeru kratším než 15 aminokyselinových zbytků se L a H doména nemohou na sebe vzájemně nekovalentně vázat a k řádné interakci mezi doménami může dojít jen při vazbě domén ze dvou sousedních řetězců (48). Více o vlastnostech scFv fragmentů v diabody formátu bude uvedeno níže, v kapitole 5.6.

5.2 Exprese

Funkční, vazebné a strukturní studie jsou náročné na množství a čistotu rekombinantních protilátek, proto bylo potřebné vytvořit optimální expresní a purifikační protokol na jejich produkci. V našem případě byly vyzkoušeny a optimalizovány dva způsoby bakteriální exprese v *E. coli* (exprese řízená do cytoplasmy nebo do periplasmy) a jeden způsob exprese v eukaryotických hmyzích S2 buňkách, sloužící mimo jiné i pro získání N-glykosylovaného produktu. Bakteriální exprese má řadu výhod, jako jsou mj. krátká generační doba, relativně jednoduchá kultivace v levném médiu a poměrně vysoké výtěžky rekombinantních proteinů.

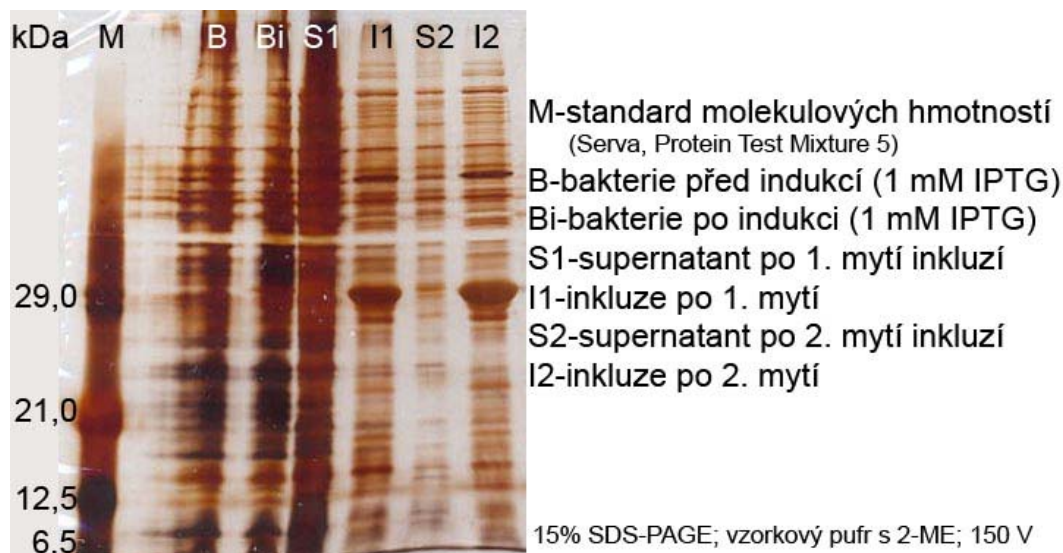
Bakteriální exprese do cytoplasmy

E. coli BL21(DE3) je jeden z nejčastěji používaných produkčních kmenů pro expresi scFv fragmentů. Jako příklad exprese s akumulací produktu do cytoplasmatických inkluzních tělísek lze v této práci uvést scFv fragmenty protilátek TU-20 a M75. Expresní vektor obsahuje T7 promotor, který je indukován přidavkem 1 mM IPTG. Jak vidět na obrázku 26, v relativně krátké době je docíleno produkce velkého množství scFv, který se akumuluje v cytoplasmě ve formě nerozpustných agregátů, tzv. inkluzních tělísek. Vznik inkluzních tělísek byl pozorován za použití fázově-contrastního mikroskopu (174). Po čtyřech až pěti hodinách od indukce byly inkluze pozorovány ve 100 % bakterií, 80 % z nich bylo bipolárních. Bakterie byly sklizeny centrifugací a výtěžek z 1 litru bakteriální kultury činil typicky cca 8 g biomasy.



Obrázek 26: Bakteriální růstová křivka *E. coli* BL21(DE3) při produkci scFv fragmentu; IT-inkluzní tělíška.

Produkce rekombinantních proteinů v bakteriích ve formě inkluzních tělísek má vedle vysokého výtěžku i další výhody. Rekombinantní protein je v této formě vysoce koncentrovaný, je nepřístupný proteolytickému působení bakteriálních proteas a je výrazně usnadněn první purifikační krok.



Obrázek 27: Postup čištění cytoplasmatických inkluzí; 15% SDS-PAGE barvený stříbrem.

Inkluzní tělíska byla izolována standardní metodou (27, 175) spočívající v rozbití buněk, centrifugaci inkluzí a jejich omytí neionickým detergentem (viz kap. 4.2.3.1). Na obrázku 27 je SDS-PAGE gel, na kterém jsou zachyceny jednotlivé kroky purifikace inkluzních tělísek. V průběhu mytí inkluzí je odstraněna většina kontaminujících proteinů a jejich hlavní složkou zůstává scFv o velikosti cca 29 kDa (obrázek 27, dráha I2). Výtěžek z 1 litru bakteriální kultury činil typicky okolo 0,6 g částečně vyčištěných inkluzních tělísek.

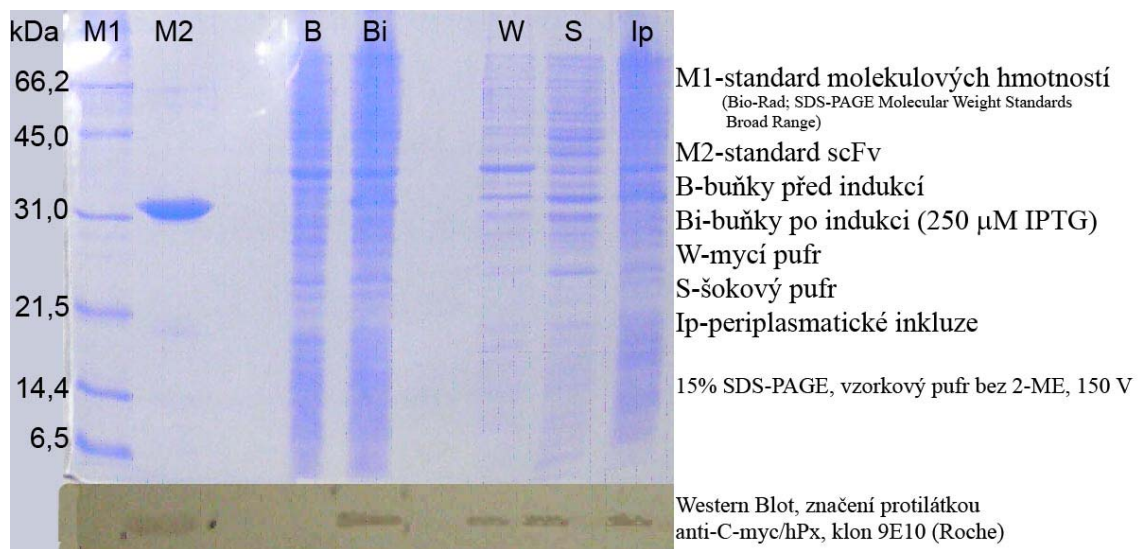
Bakteriální exprese do periplasmy

Expese rekombinantních fragmentů protilátek do cytoplasmy má vedle zmiňovaných výhod i nevýhody zejména nutnost renaturace proteinu z inkluzních tělísek. Při tomto kroku dochází ke značným ztrátám proteinu, jež v některých případech mohou být natolik zásadní, že se vyplatí k akumulaci rekombinantního produktu využít periplasmatického prostoru. Tímto postupem lze sice získat menší počáteční množství rekombinantního proteinu, než při akumulaci do cytoplasmy, avšak protein je rozpustný a správně složený, takže není potřeba provádět jeho renaturaci. U scFv fragmentů je to obzvláště výhodné, neboť obsahují intradoménové –S–S– vazby, které se v periplasmě mají díky oxidačnímu prostředí možnost správně zformovat (96).

Pro rekombinantní fragmenty protilátek takto produkované byl použit upravený vektor pET 22b (+) se signální sekvencí pelB, která vede proteiny do periplasmatického prostoru a sama je při průchodu proteinu přes buněčnou stěnu odštěpena (194).

Izolace rozpustných forem scFv přítomných v periplasmatickém prostoru byla podrobně popsána v Metodách (kap. 4.2.3.3), a vychází z prací (182, 183).

Při „nadměrné“ akumulaci rekombinantního produktu do periplasmatického prostoru byla v případě některých scFv fragmentů pozorována tvorba nerozpustných inkluzních tělísek i v tomto kompartmentu. Potvrzení, že jde o inkluzní tělíska z periplasmy, která byla vytvořena agregací produktu až po průchodu plasmatickou membránou, poskytla N-koncová aminokyselinová analýza. Analýza (laskavě provedl dr. Zdeněk Vobúrka, ÚOCHB AV ČR, v.v.i) ukázala, že i v tomto případě, stejně jako tomu bylo při analýze rozpustné formy produktu z periplasmy, odpovídá N-konec produktu maturní bílkovině a pelB sekvence byla odštěpena.

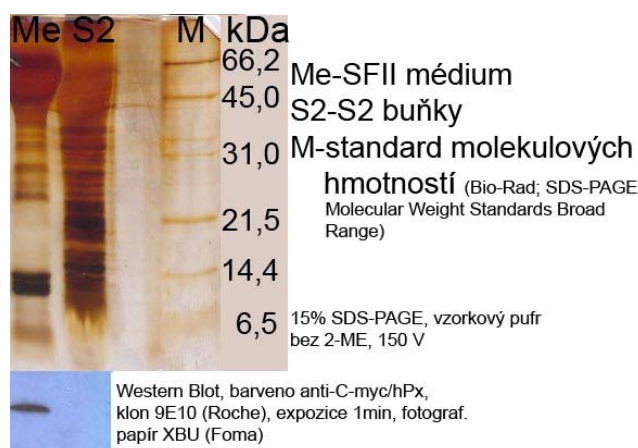


Obrázek 28: Jednotlivé kroky při izolaci rozpustných rekombinantních scFv fragmentů z periplasmatického prostoru bakterie *E. coli* BL21(DE3); 15% SDS-PAGE a Western Blot.

Obrázek 28 ilustruje jednotlivé kroky izolace produktu při expresi směřované do periplasmatického prostoru. Ve spodní části obrázku je western analýzou ověřována přítomnost produktu (reaktivního s anti-myc protilátkou) v jednotlivých frakcích. Takto analyzovány byli jak celé bakteriální buňky (před a po indukci) tak vzorky získané po omytí bakteriálních buněk hypertonickým roztokem W, šoková tekutina (S) po rozrušení periplasmatického prostoru a sediment po následné centrifugaci, který obsahuje periplasmatické inkluze. Jak vidno, stopy produktu lze detekovat již v roztoku po promytí hypertonickým roztokem. Při zpracování v menším měřítku, tj. do 500 ml bakteriální kultury, je produkt ve frakci W takřka nepozorovatelný. Jako výchozí materiál pro purifikaci scFv byla používána frakce W a S.

Expres v hmyzích S2 buňkách.

Pro produkci a testování možnosti glykosylace rekombinantních fragmentů protilátek se jevil jako nejvhodnější eukaryotní expresní systém v S2 buňkách (odvozených z buněk mušky *Drosophila melanogaster*) v kombinaci s vektorem pMT/BiP/V-5 His nesoucím BiP signální sekvenci (MKLCILLAVVAFVGLSLG) pro sekreci heterologních proteinů do média. Proteiny exprimované v tomto systému by měly být správně složené a glykosylované (195, 196). Typ glykosylace je samozřejmě charakteristický pro hmyzí buňky a jak bude více řečeno v kapitole o scFv MEM97, glykosylace byla uvažována především jako nástroj pro budoucí šetrnou derivatizaci scFv fragmentů. Western Blot analýza (obrázek 29) prokázala, že produkt je dle předpokladu přítomen v médiu, kdežto stočené S2 buňky jej neobsahují.



Obrázek 29: Expres rekombinantních scFv fragmentů hmyzími S2 buňkami; 15% SDS-PAGE a Western Blot.

5.3 Renaturace

Renaturace produktu z cytoplasmatických inkluzí byla prováděna několika způsoby. První způsob vycházel z prací (27, 176) a jeho postup je popsán v kapitole 4.2.3.2. Jde o postup poměrně nenáročný na finanční prostředky, ovšem jeho nevýhodou je pracné odstraňování ionického detergentu SLS z roztoku vazbou na iontoměnič Dovex.

Další způsob popsán v kapitole 4.2.3.2 vychází z prací (177, 178) a uplatňuje se při něm většina v současnosti používaných postupů pro renaturaci proteinů, jako je přidávání L-Arg a kontrola oxidačně redukčního prostředí daného kombinací oxidované a redukované formy glutathionu. Tento způsob je však nákladnější, neboť L-Arg a zejména glutathion jsou poměrně drahé přísady.

Při vypracování purifikační procedury pro konkrétní protilákový fragment těmto dvěma přístupům předcházely testy renaturačních podmínek. Za použití kombinace různého pH a různých koncentrací solí se testují nejvhodnější počáteční podmínky pro renaturaci. Jak je patrné z gelu (obr. 30) v případě scFv fragmentů odvozených od protilátky TU-20 (i od M75) nebylo vhodné používat renaturační pufrů s pH v kyselé oblasti. Shora zmíněné dva způsoby renaturace tedy vždy probíhaly v alkalickém pH.



Obrázek 30: Vliv pH na renaturaci scFv produktu z inkluzních tělísek; 15% SDS-PAGE.

Odlišný renaturační postup byl použit při získávání rekombinantních fragmentů protilátek z periplasmatických inkluzí. Postup vychází z práce (184) a je detailně popsán v kapitole 4.2.3.4. Na rozdíl od cytoplasmatických inkluzí se periplasmatická inkluzní tělíska rozpouštějí již v 4M močovíně a lze je snadno renaturovat bez potřeby oxidace SH skupin na cysteinových zbytcích, neboť ty jsou v oxidačním prostředí periplasmy již správně spojené do intradoménových –S–S– můstků a měly by přežít solubilizaci při nižších koncentracích močoviny. Na obrázku 31 je dokumentován postup vedoucí k získání rozpustného rekombinantního fragmentu protilátky z periplasmatických inkluzních tělísek. Jak je patrné z SDS-PAGE a Western Blotu postup však vede k využití jen menšího podílu produktu, který je v těchto v těchto inkluzích obsažen; při snaze získat větší množství produktu případným zvyšováním koncentrace močoviny při rozpouštění periplasmatických inkluzí nebylo získáno výrazně větší množství renaturovaného produktu. Část proteinu, jež nelze s periplasmatických inkluzí získat

ve formě aktivního proteinu pravděpodobně představuje protein s nesprávně vytvořenými disulfidickými můstky.



Obrázek 31: Renaturace produktu z periplasmatických inkluzí; 15% SDS-PAGE a Western Blot.

5.4 Purifikace

V této kapitole budou jen krátce nastíněny postupy, kterých bylo v této práci použito při purifikaci rekombinantních fragmentů protilátek; podrobnosti budou uvedeny v kapitolách o jednotlivých scFv fragmentech.

Použitá purifikační schémata se dají rozdělit do dvou linií vedoucích k získání dostatečně čistého scFv fragmentu příslušné protilátky v závislosti na způsobu exprese a přítomnosti His₅-kotvy, která usnadňuje první purifikační krok.

První typy scFv odvozené od protilátek TU-20 a M75 byly produkovány do cytoplasmy ve formě inkluzních tělísek a neobsahovaly ve své sekvenci His₅-kotvu. Purifikace těchto scFv vycházela z již dříve zavedeného purifikačního schématu (27) s mírně pozměněnými podmínkami, optimalizovanými pro jednotlivé scFv. Prvním krokem postupu byla ionexová chromatografie renaturovaného produktu na nosiči DEAE-Sephacel. V tomto kroku docházelo k částečnému vyčištění scFv, ale zejména k jeho koncentraci z velmi naředěného roztoku po předchozím renaturačním kroku (viz kap. 4.2.7 a 4.2.3.2). Druhým krokem byla gelová chromatografie na nosiči Sephadex G75, která měla za úkol odstranit ze vzorku vysokomolekulární agregáty scFv vzniklé při renaturaci převážně špatným spárováním –SH skupin

do interdoménových namísto intradoménových –S-S– vazeb. Třetím krokem byla opět ionexová chromatografie, v tomto případě na Mono Q, která byla v mnoha případech finálním purifikačním krokem. V tomto purifikačním kroku došlo k odstranění zbytkových kontaminantů a někdy k rozdělení produktu na několik forem, lišících se zřejmě povrchovým nábojem. Jak bude ukázáno níže na příkladu scFv TU-20 (kap. 5.7.1.1) může jít o efekt způsobený karbamylací (197) produktu během extenzivního působení roztoků močoviny při zpracování inkluzí, neboť při izolaci rozpustného produktu z periplasmy podobné rozdělení nenastává.

Později konstruované scFv fragmenty byly produkovány do periplasmy a obsahovaly ve své sekvenci His₅-kotvu. Kombinace produkce do periplasmy a přítomnost His₅-kotvy zajišťovala jak správnou tvorbu –S-S– vazeb, tak i velmi účinnou purifikaci již v prvním kroku. Prvním purifikačním krokem byla tedy afinitní IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography) chromatografie na nosiči Ni-CAM HC Resin a pro mnohé následující aplikace byla čistota těchto preparátů dostačující a nebylo potřeba dalších purifikačních kroků. Pro aplikace vyžadující „extrémně“ čisté scFv fragmenty byly zařazeny ještě následující dva purifikační kroky na vysoce účinných nosičích, ionexová chromatografie na Mono Q k rozdělení izoform scFv a zbylých kontaminujících proteinů a gelová filtrace na nosiči Superdex 200 k rozdělení monomerní, dimerní popřípadě trimerní formy scFv.

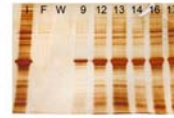
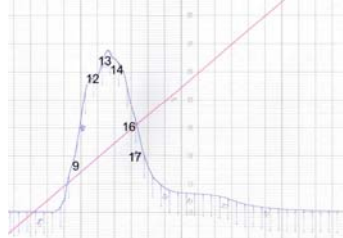
V případě glykosylovaného scFv nesoucího His₅-kotvu exprimovaného S2 buňkami do média byla za purifikační krok pomocí IMAC chromatografie vložena purifikace na afinitním nosiči Lentil Lectin Sepharose, který selektivně „vychytává“ glykosylované proteiny a tím byl oddělen glykosylovaný scFv od neglykosylovaného.

Jednotlivé purifikační postupy vedoucí k získání čistých proteinů jsou rozvedeny v příslušných kapitolách věnovaných konkrétním protilátkám a zde, na obrázku 32, je v přehledu prezentován jejich souhrn.

A

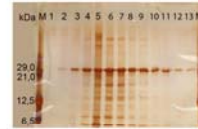
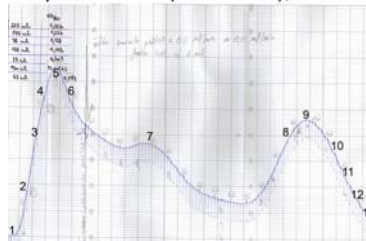
scFv fragmenty bez His₅-kotvy

↓
DEAE-Sephacel (Pharmacia); Akta Prime (Amersham Pharmacia)



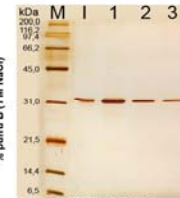
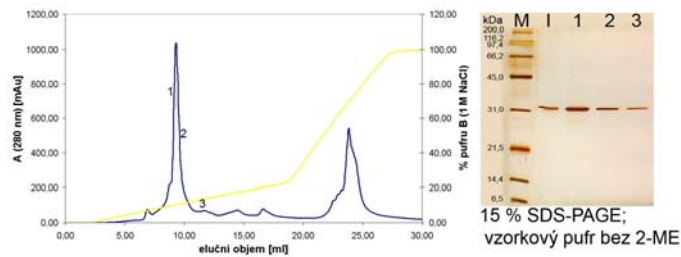
15 % SDS-PAGE;
vzorkový pufr s 2-ME

↓
Sephadex G75 (Pharmacia); Akta Prime (Amersham Pharmacia)



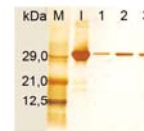
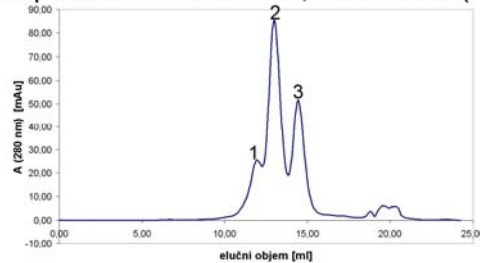
15 % SDS-PAGE;
vzorkový pufr s 2-ME

↓
Mono Q HR5/5; Akta Basic (Amersham Pharmacia)

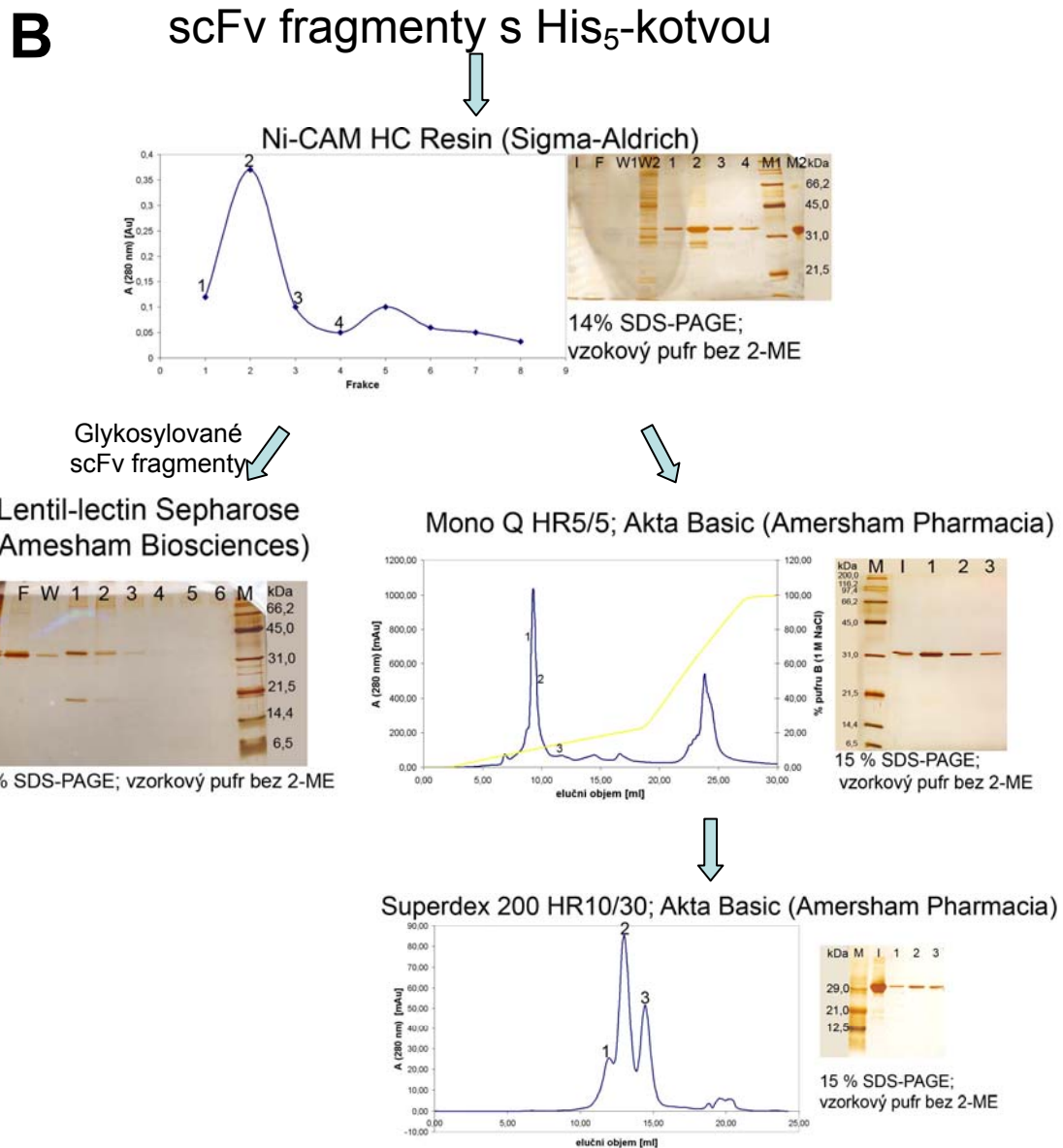


15 % SDS-PAGE;
vzorkový pufr bez 2-ME

↓
Superdex 200 HR10/30; Akta Basic (Amersham Pharmacia)



15 % SDS-PAGE;
vzorkový pufr bez 2-ME



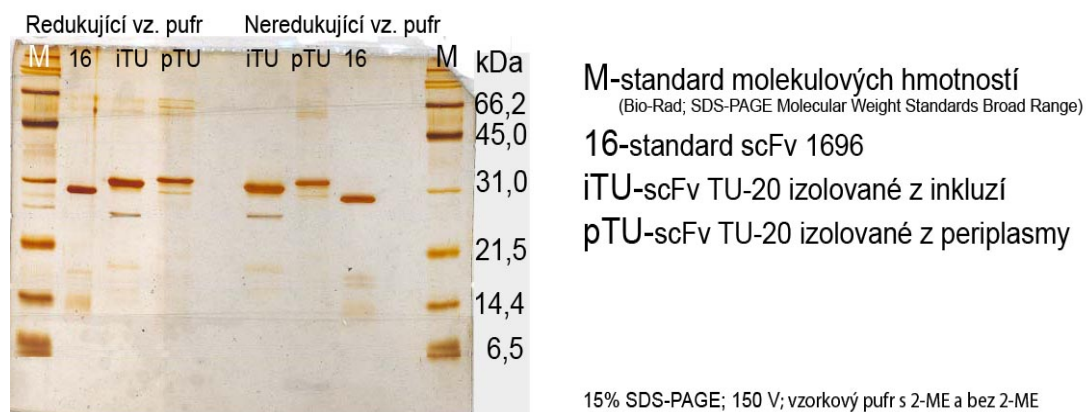
Obrázek 32: Schéma zachycující jednotlivé purifikační kroky použité k získání scFv fragmentů a jejich charakterizaci. A) Purifikační schéma pro scFv fragmenty bez His₅-kotvy. B) Purifikační schéma pro scFv s His₅-kotvou.

5.5 Analýza produktů

V této kapitole bude uveden jen stručný výčet technik, které byly použity při funkční a kvalitativní analýze připravených rekombinantních fragmentů protilátek. Přesnější popis konkrétních výsledků získaných těmito metodami a jejich přínos k charakterizaci jednotlivých rekombinantních scFv fragmentů budou dále rozvedeny v příslušných kapitolách o konkrétních protilátkách.

SDS-PAGE

Kvalitativní analýza produktu byla prováděna převážně pomocí SDS-PAGE a to jak v redukujícím, tak i neredukujícím vzorkovém pufru, což poskytovalo informace o přítomnosti agregátů, které by mohly vzniknout nesprávným párováním cysteinů. Z obrázku 33 je patrné, že vyčištěný produkt má očekávanou velikost a neobsahuje již žádné agregáty. Rozdíl ve velikostech produktu izolovaného z periplasmy a z inkluzí je způsoben přítomností C-terminální histidinové kotvy na fragmentu exprimovaném do periplasmy.



Obrázek 33: Ověření správné tvorby intradoménových -S-S- vazeb u vyčištěných rekombinantních scFv fragmentů; 15% SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufru.

WESTERN BLOT

Metodou Western Blot bylo v první řadě ověřováno, zda produkt exprese o odpovídající velikosti (jak naznačovala SDS-PAGE) je skutečně rekombinantní scFv fragment obsahující identifikační *myc* epitop; tato technika byla zejména využita při optimalizaci expresních systémů (viz výše uvedené obrázky 28, 29, 31). U fragmentů protilátek, které rozeznávají sekvenční epitopy a jejich antigen tedy může být denaturován, aniž by protilátky ztratily schopnost svůj epitop rozpoznat, lze tuto techniku orientačně využít k ověření funkčnosti fragmentu (viz níže). Pro analýzu rekombinantních fragmentů protilátky M75 tak byla jako antigen použita karbonická anhydrasa CA IX (rekombinantní protein laskavě poskytnul Mgr. P. Mader), proti jejíž „proteoglykan-like“ PG doméně, přesněji proti aminokyselinové sekvenci PGEEDLP v ní obsažené, je protilátka M75 namířena (190). Celá série těchto blotů při různých teplotách je uvedena v kapitole 5.7.2.3 věnované fragmentům odvozeným z protilátky M75. Také scFv fragment odvozený od mAb F11.2.32 rozpoznává sekvenční epitop

na chlopních HIV-1 proteasy a metodou Western Blot byla testována vazebná aktivita po renaturaci, viz kapitola 5.7.4.1.

ELISA a FACS

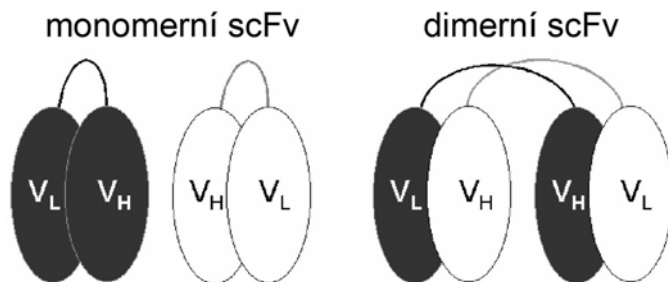
Pro volbu vhodné metody k funkční analýze protilátkových fragmentů mělo zásadní význam nejen to, zda epitop, který výchozí protilátka rozpoznává, má sekvenční nebo strukturní povahu, ale rovněž i dostupnost rekombinantního antigenu. Pro protilátku M75 byl k dispozici antigen ve formě rekombinantního proteinu CA IX. Pro protilátku TU-20 byl připraven konjugát proteinu BSA se sekvenčním epitopem ESESQGPK (C-koncový peptid z β -III-tubulinu) (198). Složitější byla situace u anti-CD20 protilátky MEM97, jejíž epitop je strukturní a jejíž antigen (protein CD20), resp. rekombinantní extracelulární doménu CD20 se nám dosud nepodařilo připravit. K funkční analýze fragmentů odvozených od mAb MEM97 byla v tomto případě použita průtoková cytometrie (FACS), na buňkách nesoucích na svém povrchu znak CD20.

Metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) tedy byla použita pro testování aktivity purifikovaných fragmentů protilátek TU-20 a M75 a metoda FACS pro funkční analýzu fragmentů odvozených od protilátky MEM97 a rovněž M75. Získané výsledky jsou uvedeny v příslušných kapitolách níže.

5.6 Vliv délky linkeru na stupeň oligomerizace scFv

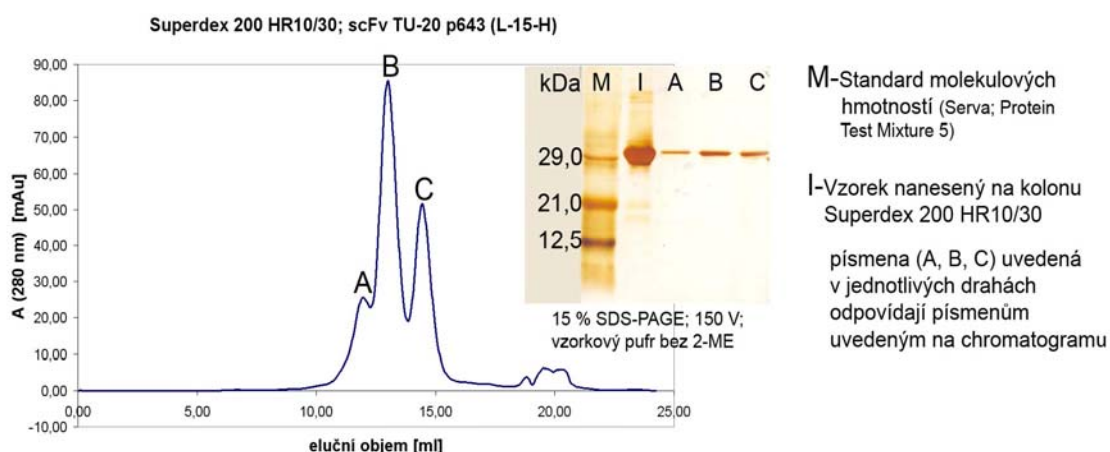
Jak již bylo pojednáno v Úvodu (kap. 2.3), mezi rekombinantními fragmenty protilátek zastávají prominentní místo stabilní dimery, trimery nebo vyšší oligomery jednovláknových scFv fragmentů, přičemž stupeň oligomerizace scFv závisí na délce linkeru mezi variabilními doménami v řetězci.

U scFv fragmentů se nejčastěji používá pro spojení lehké a těžké variabilní domény 15 aminokyselinový linker (Gly₄Ser)₃ (53, 54, 199) (viz kap. 2.3). Tento linker ovšem umožňuje vznik směsi mono-, di- a trimerních rekombinantních fragmentů i tam, kde je cílem pouze monomerní (základní) scFv. Princip vzniku těchto více-merních forem scFv je schematicky znázorněn na (obrázku 34).



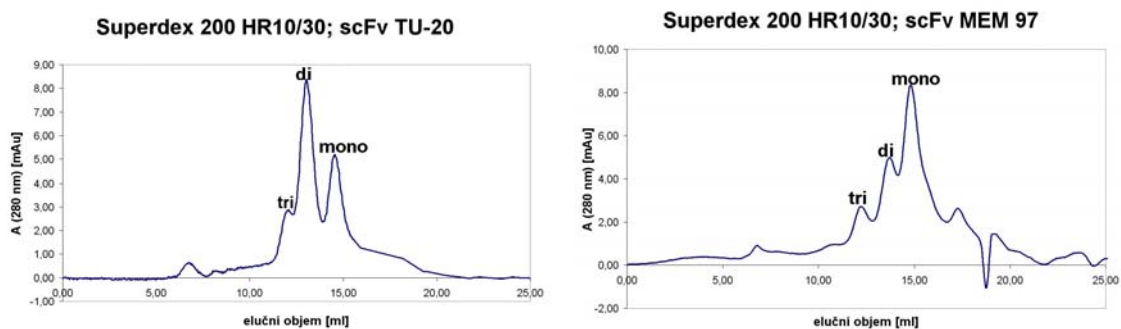
Obrázek 34: Schematické znázornění monomerního a dimerního stavu u scFv fragmentů s linkerem $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$. Převzato a upraveno z (27).

Na chromatogramu, z analýzy scFv TU-20, gelové filtrace jsou patrné tři píky, přibližně odpovídající svojí polohou monomerní (C), dimerní (B) a trimerní (A) formě scFv. Vložený záznam SDS-PAGE potvrzuje, že tyto píky opravdu obsahují jen různé formy scFv, které v denaturujícím elektroforetickém gelu migrují shodně s monomerní formou scFv.



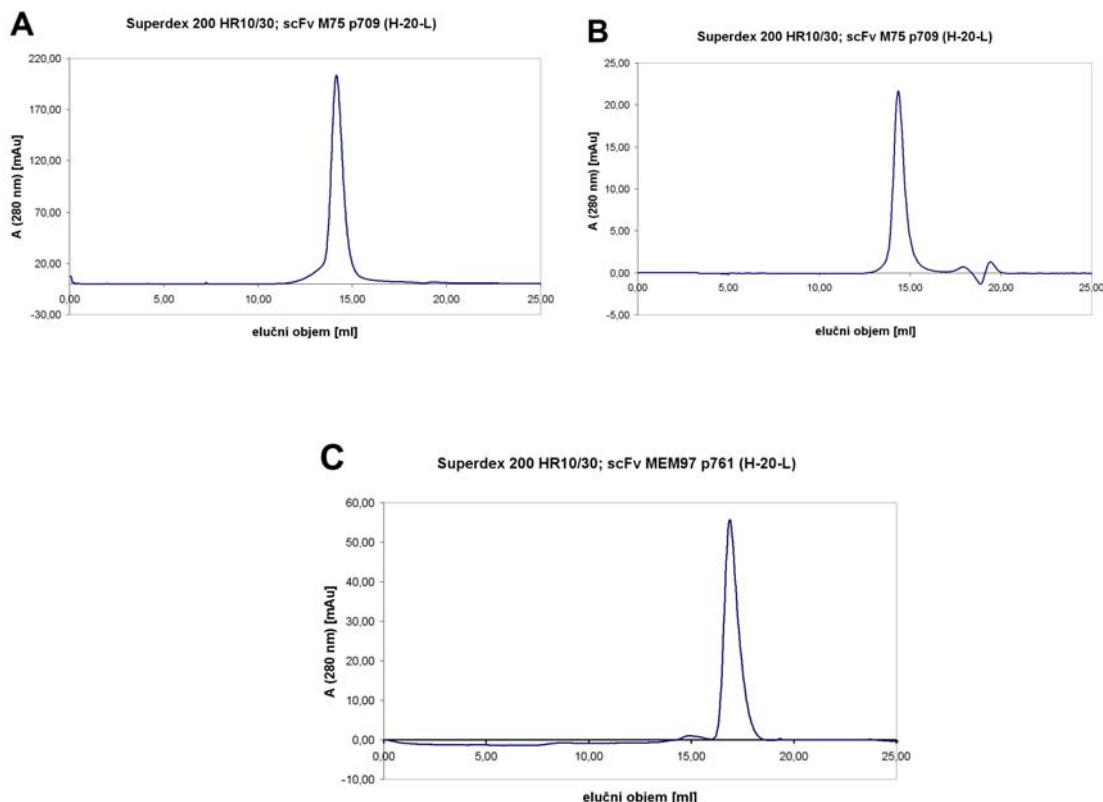
Obrázek 35: Mono-, di- a trimerní formy scFv fragmentů při použití linkeru $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$.

Rovnováha mezi jednotlivými formami je silně ovlivněna koncentrací proteinu a se stoupající koncentrací scFv byl pro řadu fragmentů pozorován nárůst obsahu multimerních forem scFv oproti monomerní (27). Tuto závislost na koncentraci naše výsledky do určité míry potvrzují. Jak je patrné z následujícího obrázku 36 ochota multimerovat je také závislá na sekvenci samotného scFv fragmentu a dva různé fragmenty (se stejnou orientací domén a délkou linkeru) mají při stejné koncentraci rozdílný poměr v zastoupení monomeru a oligomerů: u scFv TU-20 převládá dimer, kdežto u scFv MEM97 je nejzastoupenější formou monomer.



Obrázek 36: Srovnání mono- a oligo-merních forem u fragmentů scFv TU-20 a MEM97.

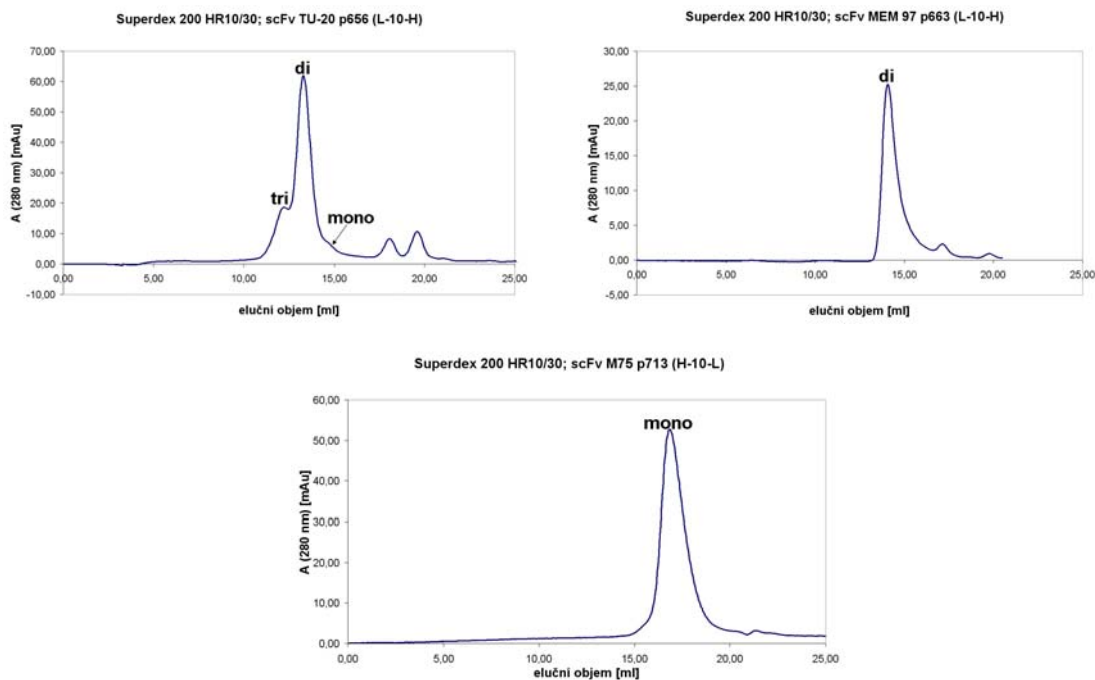
Prodloužením linkeru o jedno až dvě opakování motivu Gly₄Ser, tzn. při délce linkeru 20 nebo 25 aminokyselinových zbytků (Gly₄Ser)₄ nebo (Gly₄Ser)₅ (109, 200), dojde k posunu rovnováhy téměř výlučně ve prospěch monomerní formy scFv (64). Jak je patrné ze záznamu gelové filtrace (obrázek 37), monomerní forma převládá bez ohledu na koncentraci a sekvenci fragmentu: u scFv M75 ani zvýšení koncentrace přibližně 10x není provázeno významnou změnou poměru mezi monomerní a multimerními formami (srov. panel A, B). Stejně u scFv MEM97 (panel C) v koncentraci ležící zhruba mezi hodnotami koncentrací použitými pro scFv M75 (A,B) není patrný náznak multimerních forem. Drobný rozdíl v objemech, při kterých v tomto srovnání vytéká monomer, je zapříčiněn použitím nové kolony Superdex 200 HR10/30 v pozdějších experimentech, která vykazovala lehce odlišný dělicí profil (v kapitole 4.2.8 v Metodách jsou porovnány dělicí schopnosti použitých kolon na standardech molekulových hmotností).



Obrázek 37: Preferenční tvorba monomeru při použití linkeru $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$. Panely A a B srovnávají scFv M75 při 10 násobném rozdílu koncentrací; Panel C odpovídá scFv MEM97 při střední koncentraci.

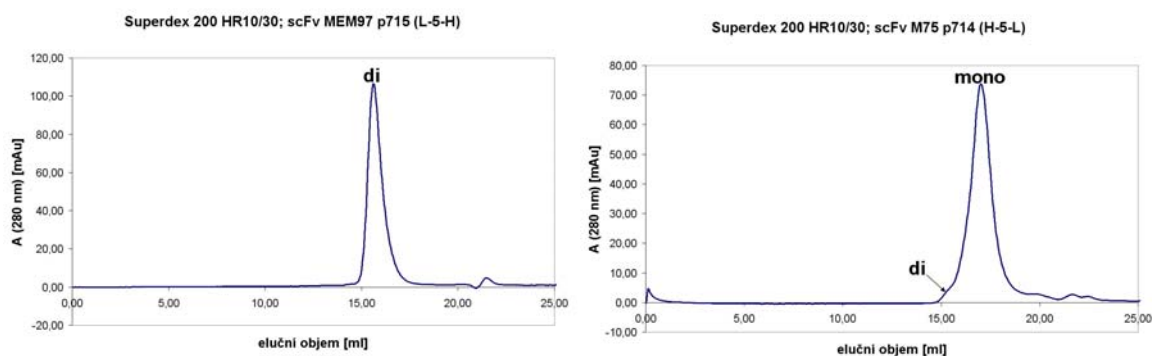
Obráceným procesem, tedy zkracováním linkeru na délku 10 aminokyselin $(\text{Gly}_4\text{Ser})_2$ a 5 aminokyselin $(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$ (200, 201), nastává posun rovnováhy ve prospěch téměř výhradně dimerní a trimerní formy scFv, tzv. „diabody“ a „triabody“ (63). Toto velmi dobře potvrzují následující chromatogramy analyzující s rekombinantními fragmenty odvozené od mAb TU-20 a MEM97. Rekombinantní fragment odvozený od protilátky M75 se však ani při tomto zkrácení linkeru nemultimerizuje a zůstává stále ve formě monomeru (viz kapitola 5.2.7). To je v souladu s naším dřívějším zjištěním, že nezáleží pouze na délce linkeru spojujícím lehkou a těžkou variabilní doménu, ale uplatňuje se i sekvence samotné protilátky.

Pro linker dlouhý 10 aminokyselin tu jsou prezentovány tři chromatogramy od tří scFv odvozených od rozdílných protilátek a jak je vidět, největší ochotu vytvářet multimerní formy má scFv odvozené od mAb TU-20, následuje scFv od mAb MEM97 a poslední je scFv od mAb M75.



Obrázek 38: Tvorba dimeru u scFv fragmentů MEM97, TU-20 a M75 s linkerem $(\text{Gly}_4\text{Ser})_2$.

Pro konstrukty s linkerem dlouhým 5 aminokyselin $(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$ jsou porovnány scFv fragmenty odvozené z mA b MEM97 a M75; podle (48, 73, 77) by se u takto krátkého linkeru měly vytvářet preferenčně dimery a trimery. Jak je ovšem z obrázku 39 patrné, scFv MEM97 vytváří čistý dimer, kdežto scFv M75 zůstává stále v monomerní formě. Ve srovnání s fragmentem obsahujícím linker dlouhý 10 aminokyselinových zbytků (obr. 38 výše) je zde patrný alespoň náznak tvorby dimeru.



Obrázek 39: Porovnání scFv fragmentů MEM97 a M75 s linkerem $(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$.

5.7 Specifické výsledky získané u jednotlivých rekombinantních protilátek

5.7.1 Rekombinantní fragmenty odvozené z mAb TU-20

Myší monoklonální protilátka TU-20 (IgG1) je namířena proti neuron-specifickému β -III-tubulinu. Protilátka byla připravena proti syntetickému oktapeptidu o sekvenci ESESQGPK (198), která odpovídá lidské sekvenci β -III-tubulinu z C-konce v pozici 441-448 (202). Třída β -III-tubulinů se u savců nachází za normálních podmínek pouze v neuronech a buňkách lokalizovaných ve varlatech a vaječnicích (203), dá se ovšem také najít například v neuroblastomech, retinoblastomech, medulloblastomech a sympatoblastomech (nádory centrální nervové soustavy) či teratomech (nádory zárodečných buněk) (198). Tím se tato monoklonální protilátka stává potenciálně zajímavou pro diagnostiku nebo dokonce pro terapii nádorů odvozených z nervové tkáně, vaječníků a varlat.

ScFv odvozené od mAb TU-20 byly jedny z prvních scFv fragmentů (po scFv 1696), které byly v naší laboratoři připraveny (pro konstrukci viz Metody, kap. 4.2.1). Většina základních pokusů (základní renaturační metoda; základní schéma purifikace) byla vždy nejdříve prováděna na nich a až následně aplikována na scFv fragmenty odvozené z dalších mAb M75 či MEM97. Pro roli modelového scFv fragmentu se TU-20 dobře hodilo i vzhledem k výhodným vlastnostem umožňujícím jednoduché testování vazebné aktivity.

Postupem uvedeným v Metodách (kap.4.2.1) byla z buněk příslušného hybridomu klonována cDNA odpovídající variabilním úsekům mAb TU-20 a sestavena do scFv molekuly. Odpovídající aminokyselinová sekvence lehké (červeně) a těžké (modře) variabilní domény fragmentu scFv TU-20, zde s 15aa dlouhým linkerem (fialově), a s podtrženými CDR úseky zodpovědnými za vazebnou specifitu, je uvedena níže.

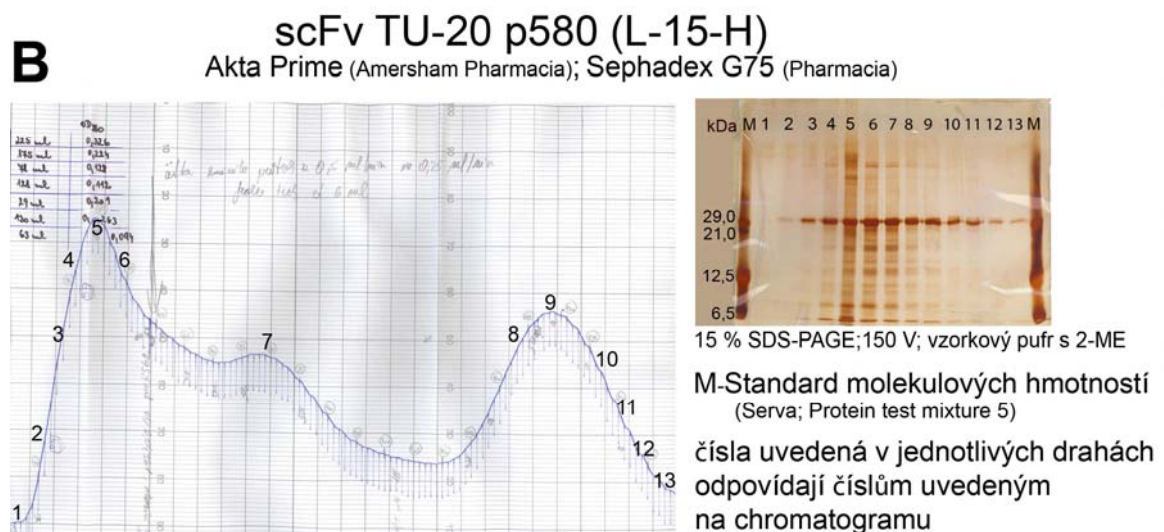
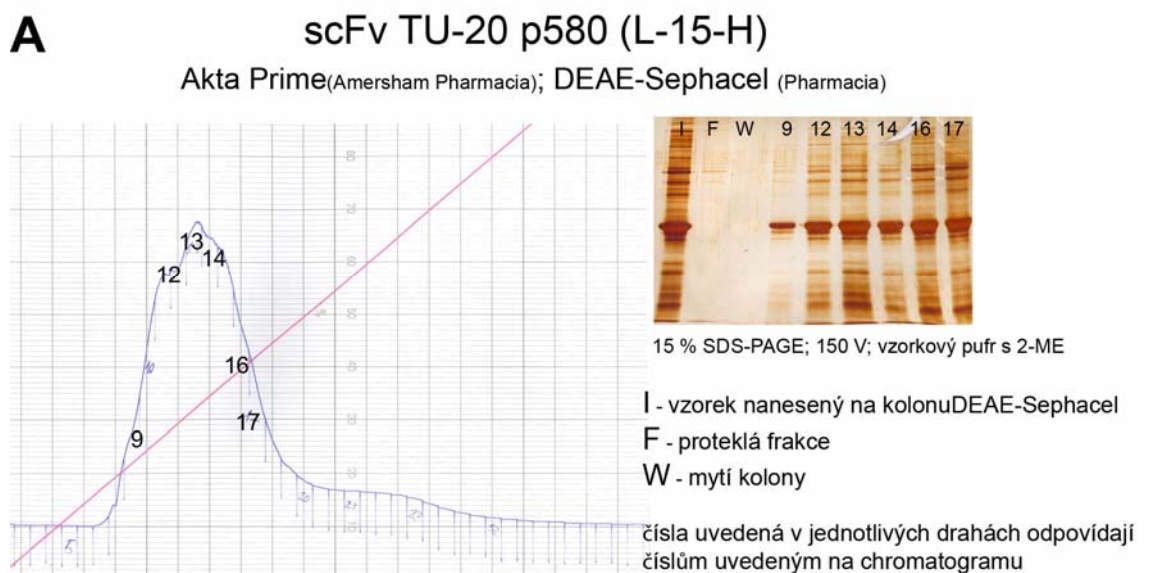
MDIVMTQSPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSN
RFSGVPDRFSGTSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLEIK

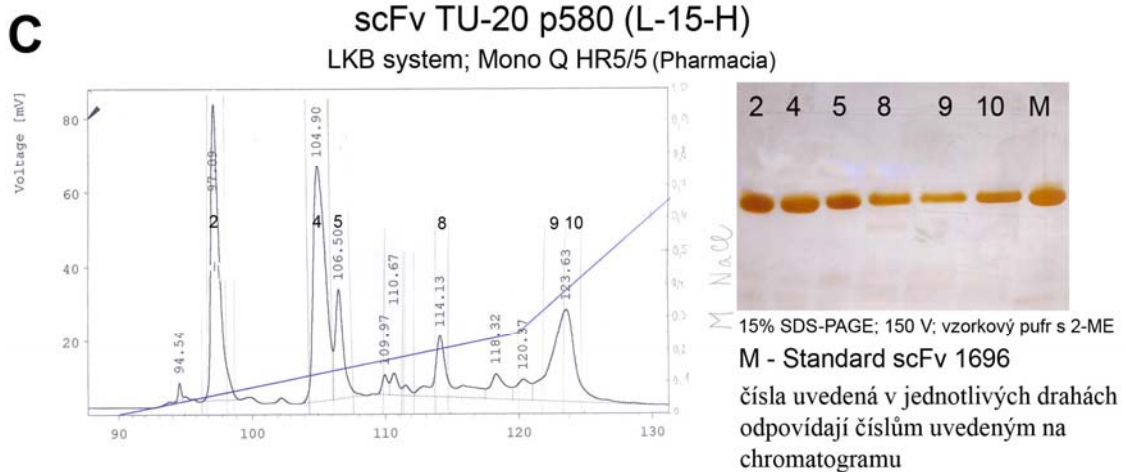
GGGGSGGGSGGGGS

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKDTFMHWVKERPEQGLEWIGRIDPANGNTK
YDPKFQGKATITADTFSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARGSRYAWFVYWGQGTTVTVSS

5.7.1.1 Purifikace

Při purifikaci rekombinantních fragmentů TU-20 byly použity dva rozdílné postupy. První byl vyvinut v naší laboratoři již dříve pro scFv 1696 (27), který ve své sekvenci neobsahuje His₅-kotvu a je produkován do cytoplasmy, kde se ukládá ve formě inkluzních tělísek. Tento původní postup byl pro scFv TU-20 upraven a následně použit i pro scFv M75. Skládá se ze tří purifikačních kroků kombinujících metody ionexové chromatografie a gelové filtrace, kterými byl získán velmi čistý protein při celkovém výtěžku 3-5 mg na 1 litr bakteriální kultury. Průběh jednotlivých purifikačních kroků je dokumentován na obrázku 40 i s příslušnými SDS-PAGE analýzami frakcí z jednotlivých chromatografických kroků.

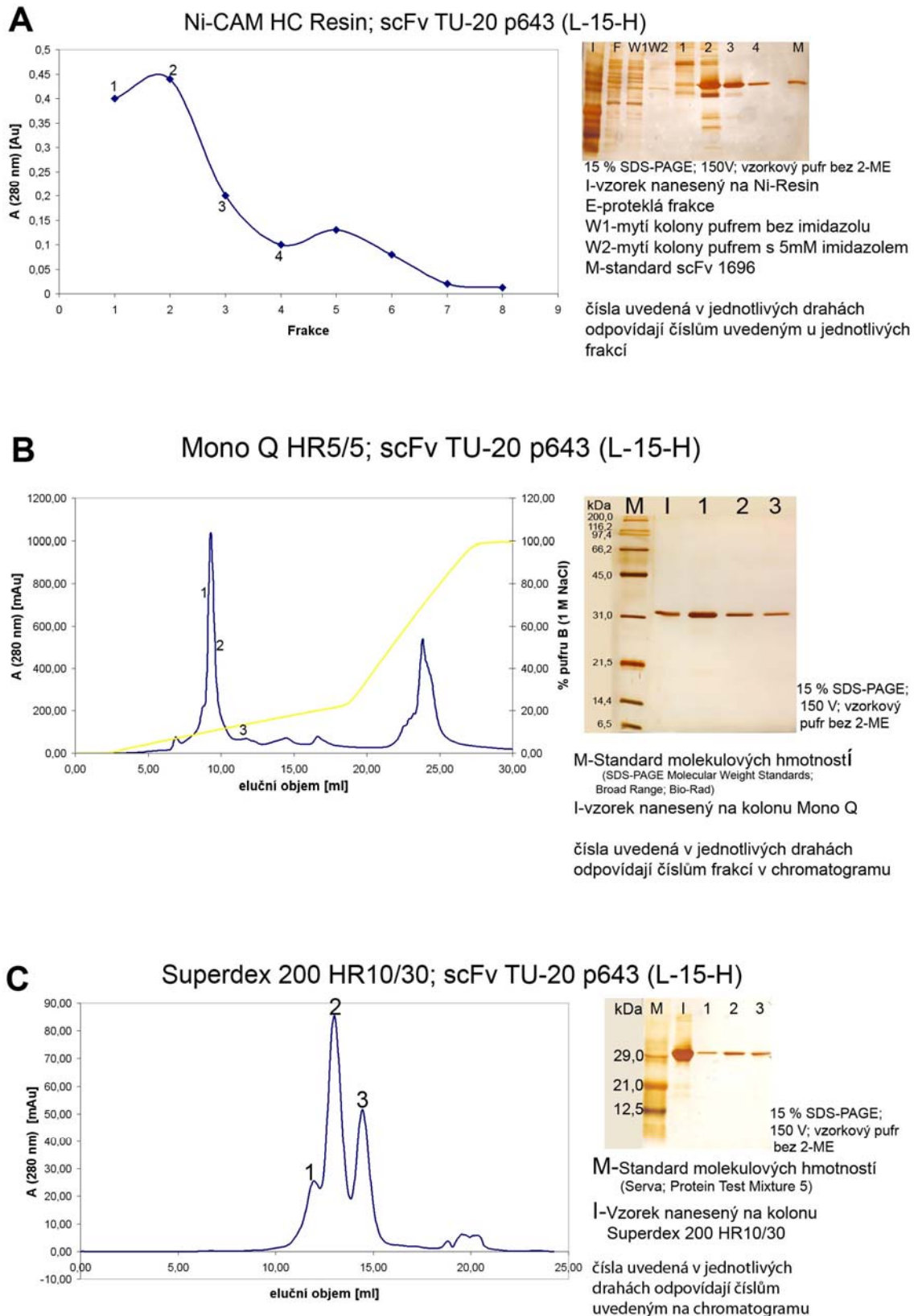




Obrázek 40: Purifikační schéma pro scFv TU-20 fragmenty bez histidinové kotvy produkované do cytoplasmy. A) Ionexová chromatografie na DEAE-Sephacel. B) Gelová filtrace na Sephadex G75. C) Finální purifikační krok na koloně Mono Q HR5/5.

Hlavní frakce z poslední kolony MonoQ představují vysoce čistý produkt (viz SDS-PAGE); příčiny rozdělení produktu do těchto frakcí nejsou úplně jasné a například dvě největší frakce (č.2 a 4), které byly testovány, jsou obě aktivní. Na MonoQ dělení nastává na základě rozdílů v povrchovém náboji, k nimž by mohlo docházet mj. multimerizací, částečnou deamidací Gln či Asn zbytků nebo karbamylování aminových skupin při extenzivních dialýzách proti roztokům močoviny (197).

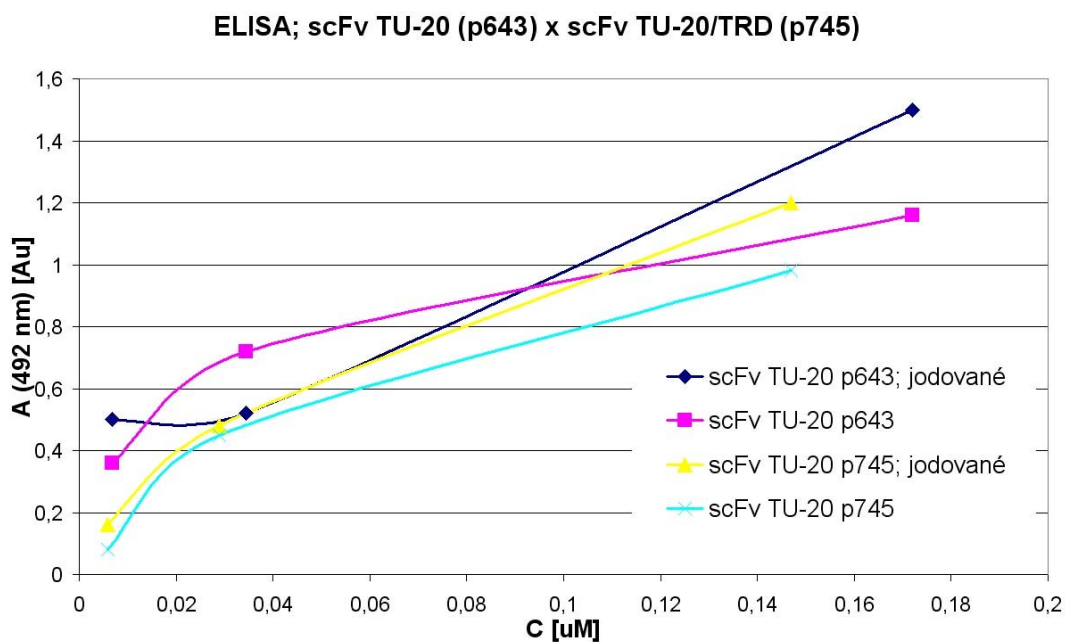
Druhý postup byl vyvinut pro rekombinantní fragmenty, které mají ve své sekvenci His₅-kotvu a jsou produkovány do periplasmatického prostoru *E. coli*. Zde byla jako první krok použita afinitní chromatografie na IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) usnadňující purifikaci pomocí interakcí mezi His₅-kotvou na rekombinantním fragmentu a Ni iontem vázaným na agarosové matici. V našem případě byl použit nosič Ni-CAM HC Resin (SigmaAldrich). Tím se podařilo pro následující pokusy získat dostatečně čistý (80%-95%) scFv TU-20 v množství 1-3 mg na 1 litr bakteriální kultury. V některých případech, při snaze získat maximálně čistý protein, byla ještě zařazena ionexová chromatografie na Mono Q (Pharmacia) či gelová filtrace na Superdex 200 (Pharmacia). Jednotlivé purifikační kroky s testováním jejich účinnosti jsou ukázány na obrázku 41.



Obrázek 41: Purifikační schéma pro scFv TU-20 fragmenty s histidinovou kotvou produkované do periplasmatického prostoru. A) Afinitní chromatografie na Ni-CAM HC Resin. B) Ionexová chromatografie na koloně Mono Q HR5/5. C) Finální purifikační krok na koloně Superdex 200 HR10/30.

5.7.1.2 Stanovení aktivity rekombinantních fragmentů TU-20

Pro testování aktivity rekombinantních fragmentů TU-20 byla využita ELISA na komerčních mikrotitračních destičkách nesoucích již navázaný antigen, epitopový peptid konjugovaný na BSA (Vidia). V pozdějších pokusech byly mikrotitrační destičky této firmy nahrazeny mikrotitračními destičkami připravenými v naší laboratoři (viz kap. 4.2.12). Typický výsledek ELISA testu s fragmentem scFv TU-20 byl již uveden výše, v úvodní pasáži pojednávající o způsobech analýzy rekombinantních fragmentů (kap. 5.5). Následující obr. 42 ilustruje v ELISA testu, že i námi modifikovaný rekombinantní fragment scFv TU-20 nesoucí na C-konci doménu bohatou na tyrosinové zbytky (scFv TU-20/TRD, p745) neztrácí po jodaci vazebnou aktivitu. V současné době se na pracovišti ÚJV a.s. (Řež u Prahy) testuje, zda je možné takto derivatizované fragmenty označit jodem do vyšší specifické aktivity.



Obrázek 42: Vliv TRD domény a jodace na vazebnou aktivitu scFv fragmentů TU-20.

5.7.1.3 Využití scFv konstruktů TU-20 dalšími partnery

V rámci probíhajících spoluprací byl plazmid kódující scFv TU-20 předán laboratoři dr. K. Angelise z ÚEB AV ČR, kde sloužil jako základ ke konstrukci specializovaných vektorů pro expresi v rostlinných buňkách, s cílem vypracovat metodu zajišťující produkci (glykosylovaných) scFv fragmentů potenciálně vhodnějších k diagnostickému či terapeutickému použití, než je tomu u produktů bakteriálního původu.

Vyčištěná bílkovina scFv TU-20 byla dále poskytnuta dr. M. Fišerovi z ÚJF AV ČR k testování značení scFv fragmentů radioaktivními nuklidy, s cílem zavést metodické postupy radioaktivního značení scFv (204).

V souvislosti s radioaktivním značením rekombinantních fragmentů protilátek bylo u této modelové protilátky v naší laboratoři a ve spolupráci s dr. Marcelou Múdrrou (ÚMB SAV, Bratislava) navrženo, zkonstruováno a exprimováno několik scFv fragmentů obsahujících chelatační oligopeptidové sekvence, které by měly zvyšovat schopnost rekombinantních fragmentů vázat radionuklidy, jmenovitě yttrium. Tyto scFv konstrukty jsou v současnosti v ÚJV a.s., Řež u Prahy. Jako standard je používán nemodifikovaný scFv TU-20.

5.7.2 Rekombinantní fragmenty odvozené z mAb M75

Myší monoklonální protilátka M75 je namířena proti enzymu karbonická anhydrasa IX (CA IX). CA IX ve své transmembránové formě obsahuje dvě extracelulární domény: vlastní katalytickou doménu CA a N-koncový proteoglykanu podobný segment PG, který zprostředkovává mezibuněčnou adhezi. PG doména má převážně negativní náboj, což je způsobeno velkým množstvím karboxylových aminokyselinových zbytků sdružených v několikrát se opakujícím motivu GEEDLP (190). Právě tento motiv je rozpoznáván protilátkou M75 (IgG2b) (205, 206). Odrazem převažujícího negativního náboje je snadná disociace, jak komplexu CA IX s předpokládaným buněčným povrchovým receptorem (tento vazebný partner je stále neznámý), tak i s monoklonální protilátkou M75, v již slabě kyselém pH (207).

Expresce CA IX je za normálních podmínek omezena pouze na trávicí trakt. Vyskytuje se ovšem ve vysokém procentu hypoxických nádorů tkání, ve kterých je za normálních podmínek její exprese negativní (205, 207). Zdá se pravděpodobné, že tento enzym spolu s karbonickou anhydrasou XII je odpovědný za udržování kyselého pH extracelulárního prostředí nádorových buněk, které pravděpodobně umožňuje růst, rozšiřování a metastazování nádoru (208).

CA IX tedy představuje důležitý a slibný biomarker, využitelný v diagnostice a potenciálně i v terapii jako vhodný cíl specifického protinádorového zásahu (205, 207). Příprava a detailnější charakterizace rekombinantních fragmentů monoklonální protilátky M75 jsou k tomu důležitým předpokladem.

Konstrukce scFv a dalších fragmentů mAb M75 z buněk příslušného hybridomu je podrobně popsána v Metodách (kap. 4.2.1). Odpovídající aminokyselinová sekvence těžké (modře) a lehké (červeně) variabilní domény fragmentu scFv M75, zde s 20 aa dlouhým linkerem (fialově), a s podtrženými CDR úseky zodpovědnými za vazebnou specifitu, je uvedena níže.

MEVQVVESSGGGLVQPKGSLKLSVCVVSGSTLNNYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSQSMIYLQMNNLKTEDTAMYYCVTYGNHPFAYWGQGTTVT
S

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

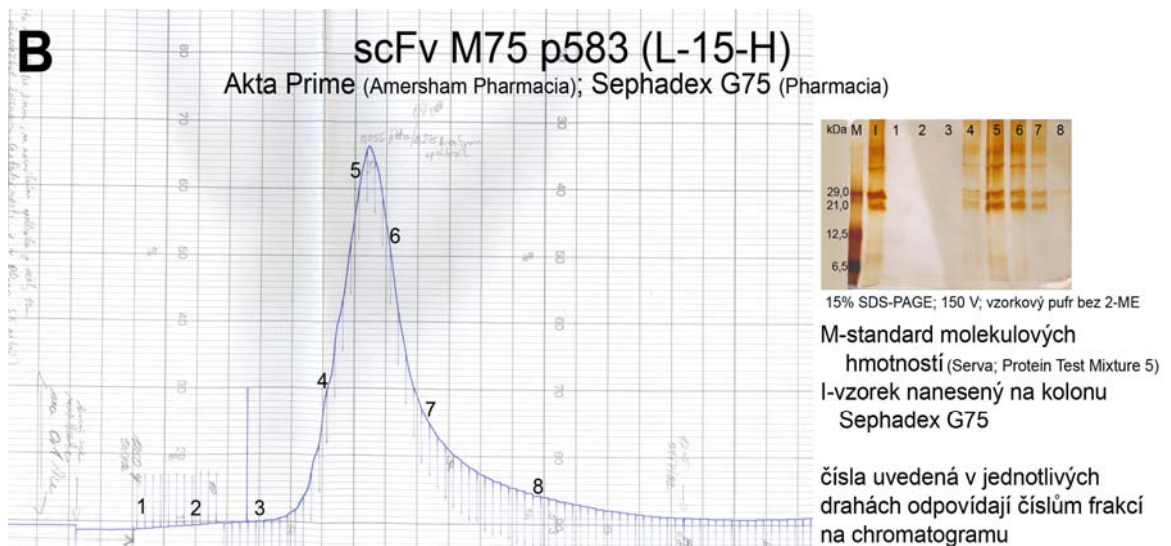
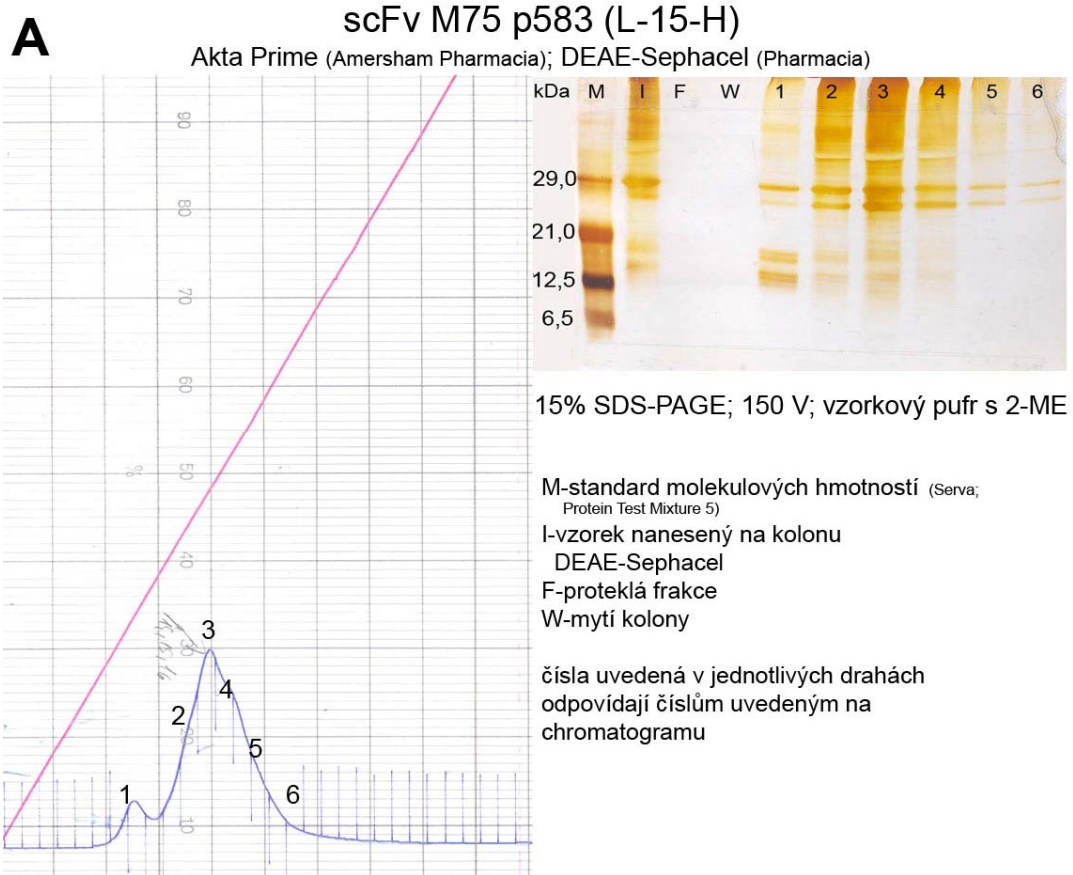
DIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPNLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGSGTKLEIKR

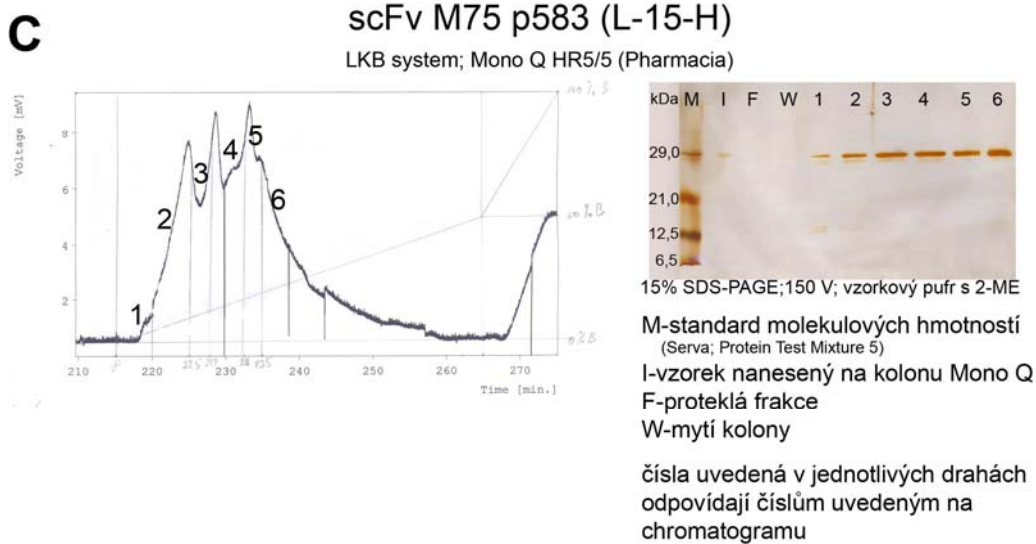
Aminokyselinová sekvence variabilních domén, zjištěná v průběhu konstrukce z klonovaných cDNA fragmentů, byla využita i při řešení 3D-struktury komplexu Fab fragmentu M75 s epitopovým peptidem (209).

Z vyřešené krystalové struktury Fab fragmentu protilátky M75 vyplynulo, že N-konec V_H -domény hraje určitou roli při vazbě antigenu (209). V prvních scFv fragmentech odvozených od této protilátky byla orientace domén v pořadí V_L - V_H , tzn. že amino-konec těžkého řetězce vázaný k linkeru nemá úplnou volnost pohybu. V literatuře se uvádí, že obě orientace, V_L - V_H i V_H - V_L , jsou rovnocenné a jejich zastoupení v různých pracích je asi 1:1 (47). U nejstaršího scFv fragmentu 1696 (27, 210, 211) pocházejícího z naší laboratoře byl zvolen formát V_L - V_H a pro tento formát byla upravena i restriční místa v scFv kazetě, do které se zasazovaly reamplifikované fragmenty DNA. Vzhledem k počátečním nejednoznačným výsledkům měření aktivity v ELISA testech a s ohledem na informaci získanou z rentgenostrukturní analýzy byla pro scFv M75 připravena i verze s obrácenou orientací domén V_H - V_L . Jak se ukázalo později, obě orientace jsou funkční (viz kap. 5.7.2.5) a počáteční problémy s aktivitou byly spíše technického rázu. Přesto se ale zdá, že v řadě vlastností, které se uplatňují například při purifikaci (snadná precipitace při zahušťování, stabilita preparátu při skladování) je orientace V_H - V_L u scFv fragmentu M75 výhodnější. Stejný závěr potvrzuje i ELISA sledující vliv pH na aktivitu fragmentů (viz kap 5.7.2.4).

5.7.2.1 Purifikace

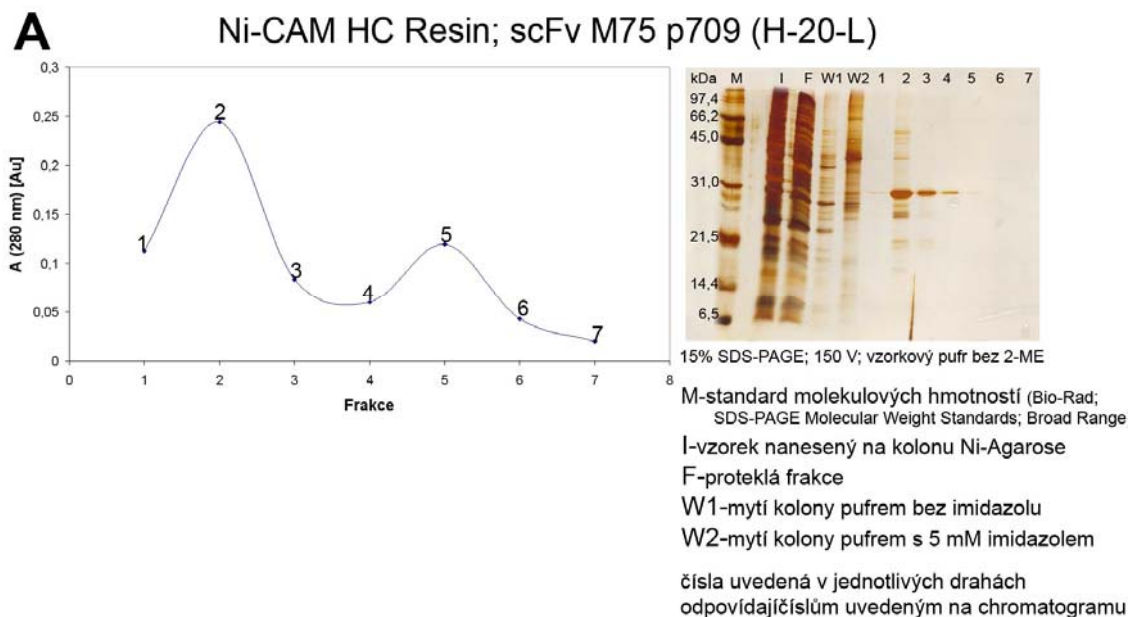
U rekombinantních fragmentů M75 byly purifikační postupy voleny s ohledem na dosažení co nejvyšší čistoty příslušných scFv fragmentů. Metody použité k charakterizaci, jako jsou ITC a DSC, vyžadují vysokou čistotu proteinů a to nejen na přítomnost kontaminujících proteinů a peptidů, ale též na přítomnost různých oligomerních forem scFv fragmentu. Při purifikaci rekombinantních fragmentů M75 byly, podobně jako u scFv TU-20, vyvinuty dva postupy vedoucí k získání scFv M75 ve velmi vysoké čistotě (cca. 95-99 %). Postup zvolený pro scFv M75 bez His₅-kotvy (první scFv od mAb M75 produkované ve formě cytoplasmatických inkluzí) zahrnoval dvě ionexové chromatografie a jednu gelovou filtraci v následujícím pořadí: ionexová chromatografie na DEAE-Sephacel, při které dochází primárně k zahuštění scFv po jeho naředění v renaturačním kroku; gelová filtrace na koloně Sephadex G75 pro oddělení vysokomolekulárních agregátů od monomerního scFv; ve finálním kroku tohoto purifikačního schématu byla použita chromatografie na Mono Q, která oddělila zbývající kontaminanty a rozdělila podle povrchového náboje různé izoformy produktu (srov. podobný jev u scFv TU-20 z inkluzí, kap. 5.7.1.1). Takto se podařilo získat velmi čistý scFv M75 p583 (viz purifikační schéma na obrázku 43) v množství 2-3 mg čistého proteinu na 1 litru bakteriální kultury.

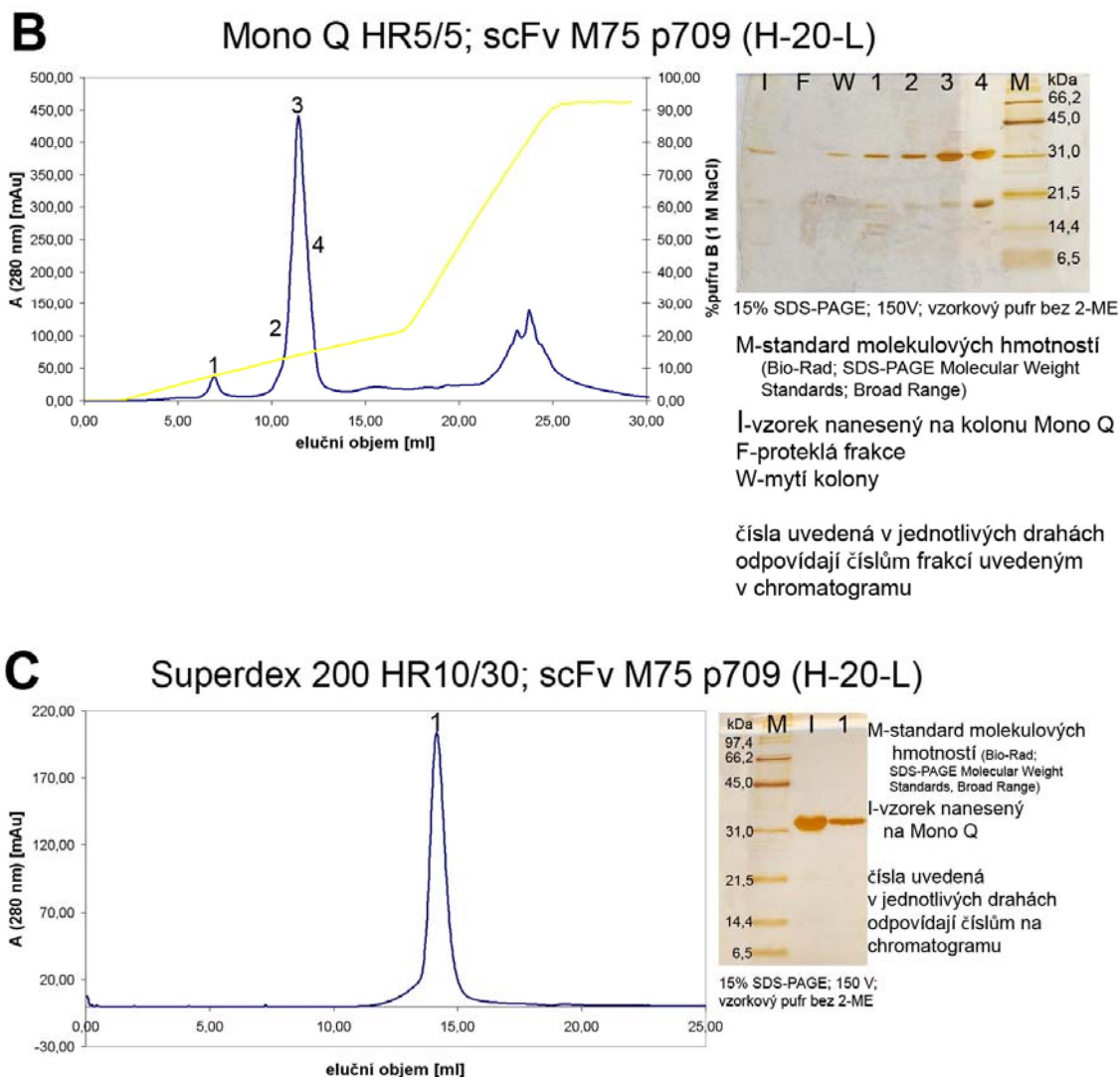




Obrázek 43: Purifikační schéma pro scFv M75 fragment produkovaný do cytoplasmy bez histidinové kotvy. A) chromatografie na ionexovém nosiči DEAE-Sephacel. B) gelová filtrace na nosiči Sephadex G75. C) Finální purifikace na koloně Mono Q HR5/5.

U rekombinantních fragmentů M75 s připojenou His₅-kotvou je purifikace zjednodušena a první dva kroky (ionexová chromatografie na DEAE-Sephacel a gelová filtrace na Sephadex G75) jsou nahrazeny afinitní chromatografií Ni-CAM HC Resin, po které následuje ionexová chromatografie na Mono Q HR5/5 a finálním krokem je zde gelová chromatografie na Superdex 200 HR10/30. Celkem se získalo z 1 litru bakteriální kultury 1-4 mg čistého funkčního proteinu. Jednotlivé purifikační kroky a kvalita produktů hodnocená pomocí SDS-PAGE analýzy jsou na obrázku 44.





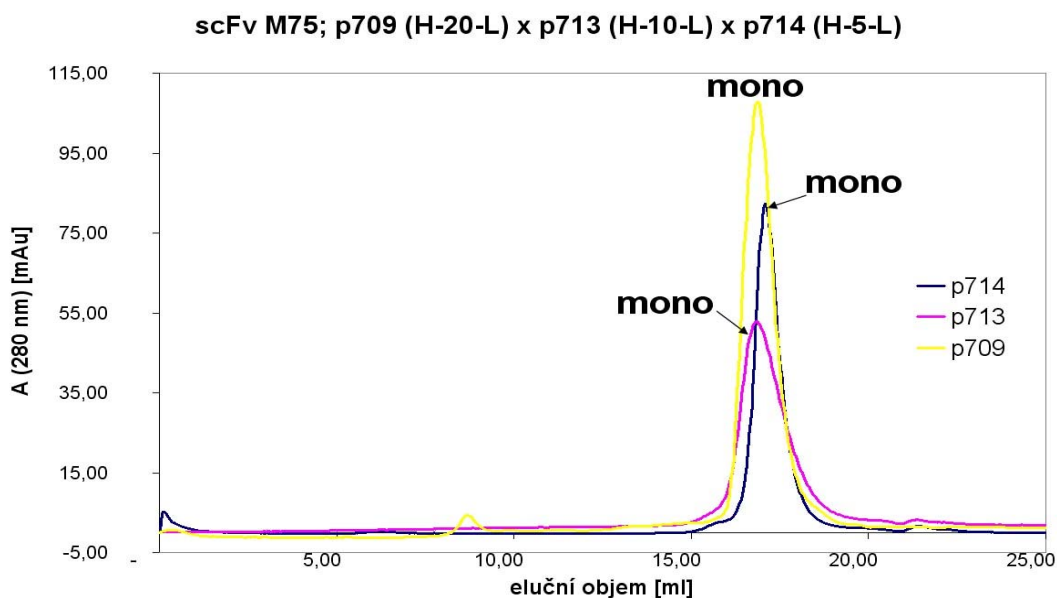
Obrázek 44: Purifikační schéma pro scFv M75 fragmenty s histidinovou kotvou produkované do periplasmatického prostoru. A) afinitní chromatografie na nosiči Ni-CAM HC Resin. B) chromatografie na koloně Mono Q HR5/5. C) Finální purifikace na koloně Superdex 200 HR10/30.

5.7.2.2 Multimery scFv M75

Rekombinantní fragmenty odvozené od mAb M75 jsou nejlépe charakterizované scFv fragmenty připravené v rámci této disertační práce. Při jejich charakterizaci se ukázaly jisté zvláštnosti, které je v jistém smyslu favorizují jako cíl výzkumu a dalšího zájmu oproti jiným našim rekombinantním fragmentům, které se chovají standardně, jak je popsáno v literatuře. Z tohoto důvodu je zařazena tato kapitola jako samostatná část zde a nikoli v obecně pojaté kapitole 5.6 pojednávající o vlivu délky linkeru na multimerizaci fragmentů.

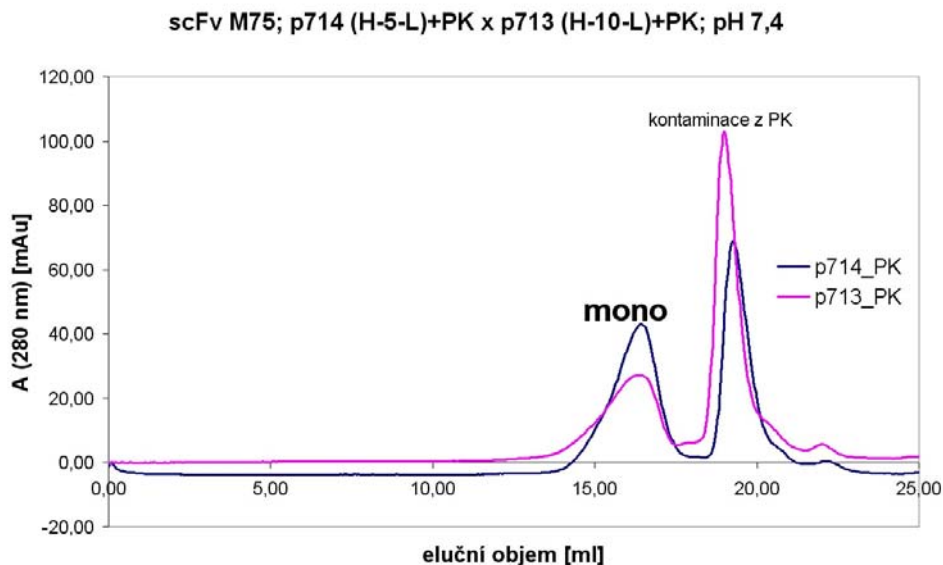
V kapitole 5.6 již byla zmínka o nestandardním chování rekombinantních fragmentů M75 při tvorbě diabody formátu. Postupným zkracováním linkeru na 10 či 5

aminokyselin, dochází ze stérických důvodů k dimerizaci dvou scFv řetězců a tvorbě tzv. diabody či triabody formy. Jak ukázaly naše analýzy, v případě scFv z mAb M75 však fragmenty zůstávají stále v monomerní podobě. Toto dokumentuje záznam z gelové filtrace na obrázku 45. ScFv fragmenty M75 obsahující linker dlouhý 10 nebo 5 aminokyselinových zbytků vytékají v objemu odpovídajícím standardnímu monomeru (linker 20 aa).



Obrázek 45: Gelová filtrace fragmentů scFv M75 s linkerem dlouhým 5 (p714), 10 (p713) a 20 (p709) aminokyselinových zbytků; Superdex 200 HR10/30 Tricorn v pufru: 100 mM Na Cl; 20 mM dieethanolamin pH 8,4.

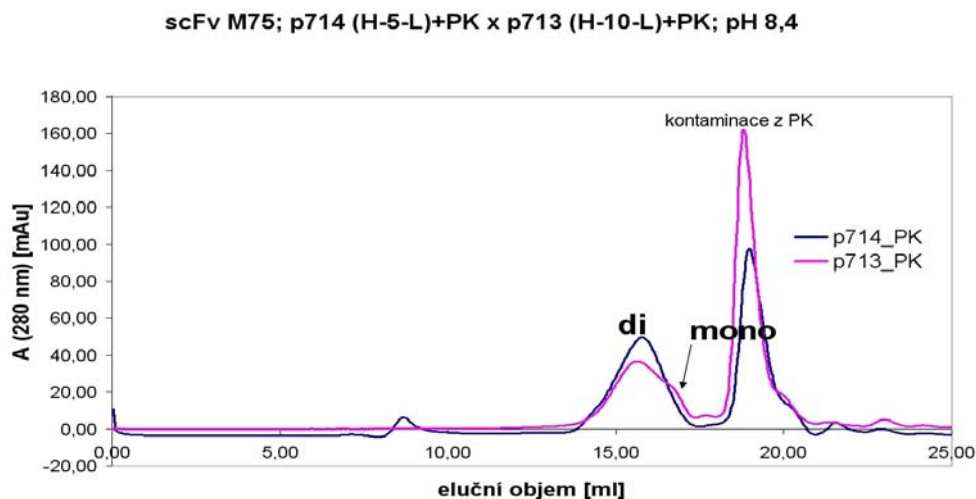
Přesto tyto fragmenty řádně fungují jak při Western Blotu tak při ELISE, což představuje paradox: fragment se zkráceným linkerem může vytvořit funkční vazebné místo pro antigen pouze interakcí V_H a V_L domén ze dvou řetězců, pak by se ovšem měl v gelové filtraci chovat jako dimer. Při gelové filtraci těchto fragmentů za přítomnosti epitopového peptidu K (190) v PBS pH 7,4 (obr. 46) došlo k mírnému posunu ve prospěch větších molekul, ale rozhodně ne do velikosti odpovídající dimeru scFv.



Obrázek 46: Gelová filtrace fragmentů scFv M75 s linkerem dlouhým 5 (p714) a 10 (p713) aminokyselinových zbytků v přítomnosti epitopového peptidu K (PK); Superdex 200 HR10/30 Tricorn v pufru: PBS pH 7,4. Jednotlivé fragmenty byly před chromatografií inkubovány 2 hodiny při 20 °C s 20 molárním nadbytkem peptidu K v PBS pH 7,4.

Teprve kombinace epitopového peptidu a pufru s vyšším pH (20 mM dieethanolamin, 100 mM NaCl, pH 8,4) vedla k viditelnému posunu na chromatogramu ve prospěch molekul velikostí odpovídající dimeru scFv-diabody (obr. 47). Jak bude popsáno níže, při analýze pomocí ITC se ukázalo, že tyto dimery mají jen jedno funkční vazebné místo pro epitopový peptid, nelze tedy hovořit o klasickém bivalentním formátu diabody.

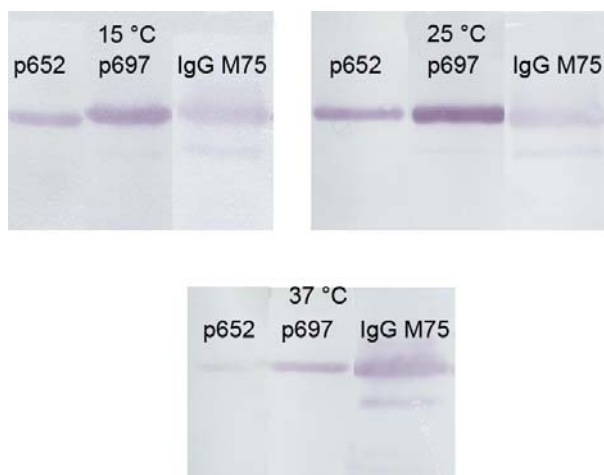
Posun směrem k dimeru ve vyšším pH je zřejmě způsoben vyšší stabilitou komplexu scFv s peptidem. Tato pozorování jsou v souladu s výsledky dr. J. Závady (212).



Obrázek 47: Gelová filtrace fragmentů scFv M75 s linkerem dlouhým 5 (p714) a 10 (p713) aminokyselinových zbytků v přítomnosti epitopového peptidu K; Superdex 200 HR10/30 Tricorn v pufru: 100 mM NaCl; 20 mM diethanolamin pH 8,4. Jednotlivé fragmenty byly před chromatografií inkubovány 2 hodiny při 20 °C s 20 molárním nadbytkem peptidu K v pufru: 100 mM NaCl; 20 mM diethanolamin pH 8,4.

5.7.2.3 Testování vlivu teploty na aktivitu rekombinantních fragmentů scFv M75

Při počátečních problémech se stanovením vazebné aktivity fragmentů scFv M75 byla provedena série testování vazebné aktivity těchto fragmentů při různých teplotách pomocí metody Western Blot. Jednalo se o hrubé stanovení vazebné aktivity scFv fragmentů s různou orientací domén, V_L -15- V_H , V_H -15- V_L , při různých teplotách s cílem nalézt optimální teplotu pro následné experimenty prováděné metodou ELISA. Jako optimální se ukázala teplota mezi 15 °C a 20 °C, kde se signál od jednotlivých rekombinantních fragmentů nejvíce podobal signálu výchozí mAb M75, jak dokumentuje následující obrázek 48.

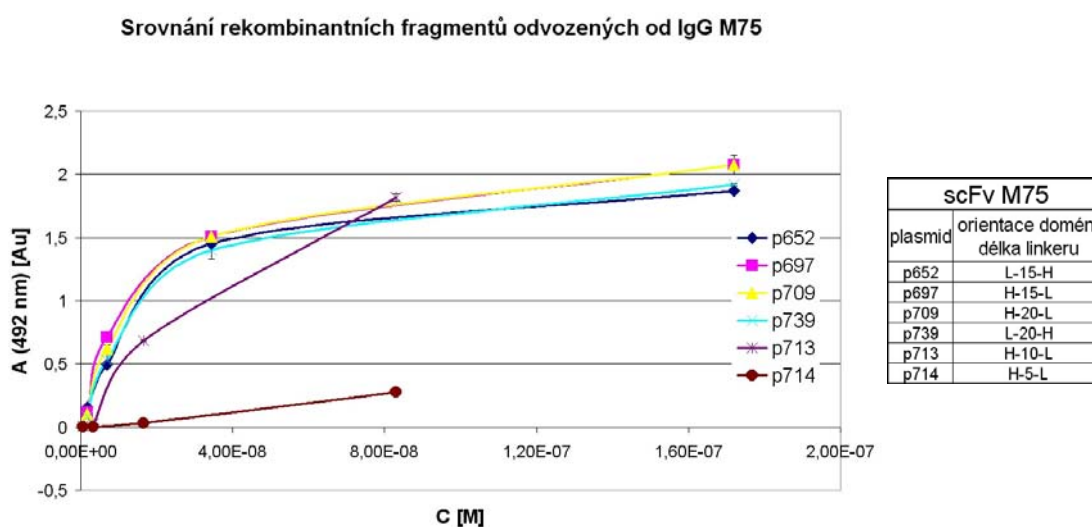


Obrázek 48: Western Blot, hrubé testování vazby scFv M75 v orientaci L-15-H (p652) a H-15-L (p697) a výchozí mAb M75 při různých teplotách (15, 25 a 37 °C). Použité množství antigenu CA IX pro jednotlivé fragmenty bylo konstantní a koncentrace jednotlivých scFv byla rovněž srovnatelná (500 nM).

5.7.2.4 ELISA – srovnání aktivity monovalentního Fab fragmentu a scFv fragmentů, vliv orientace domén a pH

ELISA je ideální metodou na testování vazebných aktivit jednotlivých rekombinantních fragmentů, pokud rozpoznávají sekvenční epitop či existuje snadno dostupný rekombinantní antigen pro rozponávání strukturního epitopu.

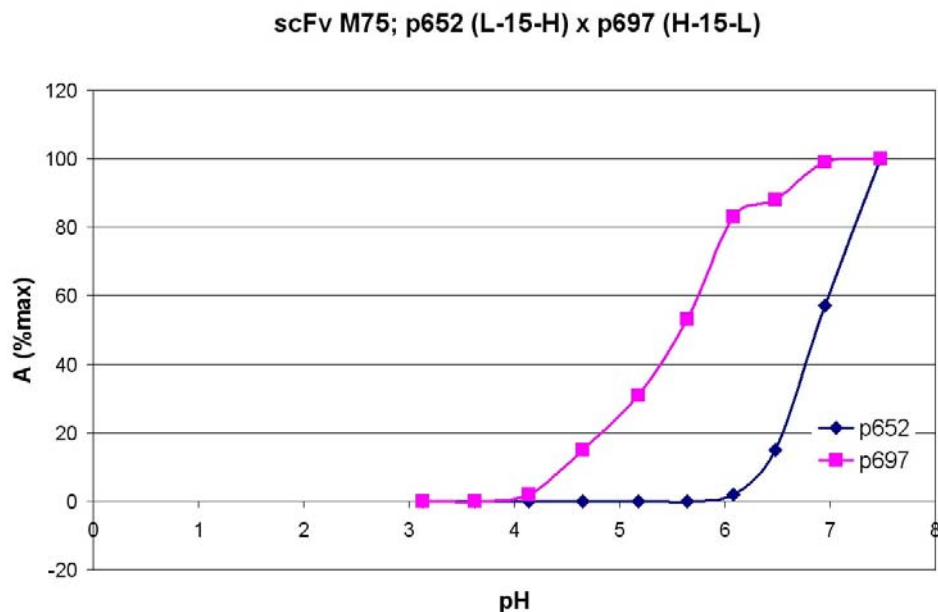
Pro porovnání vazebných aktivit jednotlivých rekombinantních fragmentů mezi sebou byla dodržena stejná koncentrace antigenu na jamku (100 ng antigenu/jamka) a koncentrace jednotlivých fragmentů se pohybovala od 1,72 nM/jamka až po 172 nM/jamka.



Obrázek 49: Srovnání jednotlivých scFv fragmentů odvozených od mAb M75 metodou ELISA v PBS pH 7,4 s 1% (w/v) BSA.

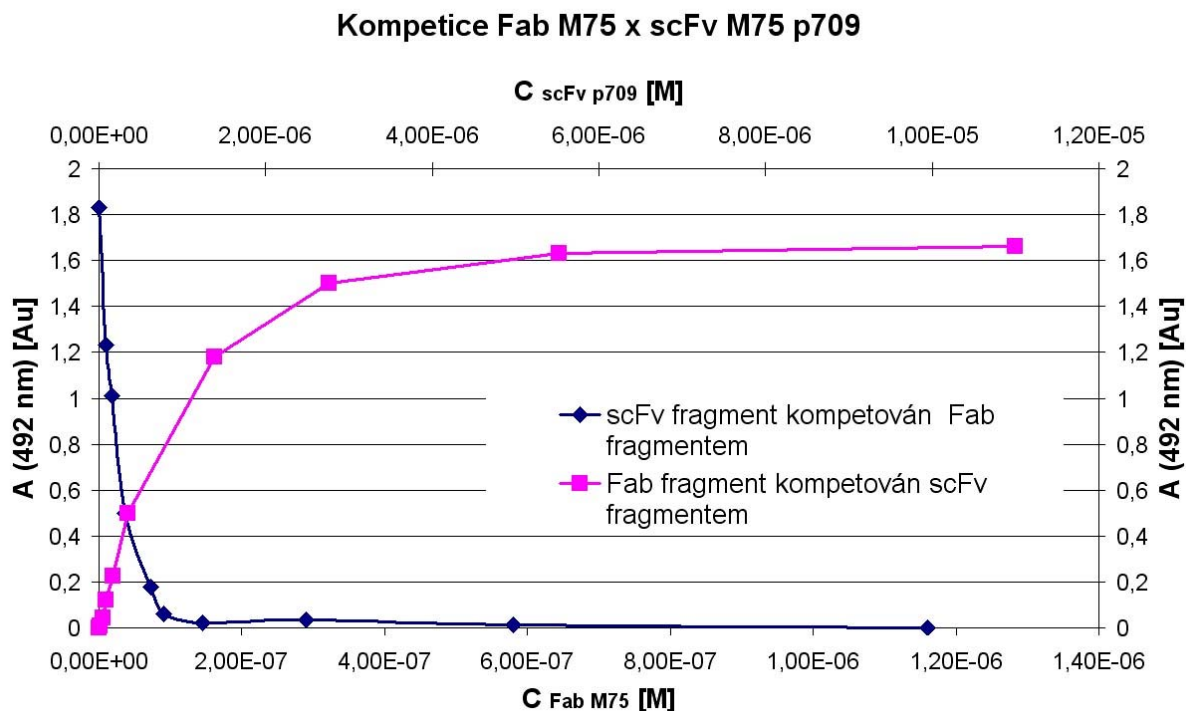
Jak je vidět z obrázku 49, největší odezvu vykazovaly scFv fragmenty typu H-20-L, H-15-L, L-15-H a L-20-H, přičemž orientace domén a délka linkeru neměly u těchto konstruktů téměř žádný vliv na vazbu.

Při testování vlivu orientace V_H a V_L domén na vazebnou aktivitu byl kromě ITC (viz kap. 5.7.2.5 níže) a přímého srovnání fragmentů při ELISA stanovení (obr. 49) za stejných podmínek (pH 7,4) sledován i vliv pH (v rozmezí hodnot pH 3,0-7,5) v ELISA analýze. Při těchto testech bylo zjištěno, že scFv s orientací domén V_L -linker- V_H je v kyselém prostředí méně stabilní než scFv s doménami v obráceném pořadí. V mírně alkalickém prostředí se tyto rozdíly již stírají, což potvrzují i výsledky z ITC, kde mezi těmito orientacemi není zásadní rozdíl v afinitní konstantě a dalších veličinách.



Obrázek 50: ELISA, porovnání vazebné aktivity scFv M75 p652 (L-15-H) a p697 (H-15-L) fragmentů v různém pH (pH bylo upraveno kombinací citrátu a fosfátu do finální koncentrace 0,1M).

Přímé porovnání vazebných schopností rekombinantních fragmentů a intaktního IgG M75 či Fab M75 není možné, neboť rekombinantně připravené fragmenty jsou vizualizovány prostřednictvím anti-myc protilátky vázané na myc epitop v scFv fragmentu, kdežto pro IgG a Fab fragmenty je použita polyklonální anti-myšší IgG sekundární protilátka s vyšším počtem vazebných míst (viz kap. 4.2.12). Tento problém byl vyřešen kompetitivním uspořádáním ELISA experimentu mezi nejlépe fungujícím rekombinantním fragmentem scFv M75 (H-20-L) a Fab fragmentem odvozeným přímo z mAb M75. Při konstantní koncentraci Fab (91 nM) lze se stoupající koncentrací kompetitoru, scFv, očekávat vzrůstající signál pocházející od anti-myc sekundární protilátky a při opačném provedení pokusu, kdy konstantní zůstává koncentrace scFv (86 nM) a roste koncentrace Fab, by signál anti-myc protilátky měl klesat. Výsledek experimentu je ukázán na obr. 51.



Obrázek 51: Porovnání vazby scFv M75 proti Fab M75 pomocí kompetitivní ELISA. Byl sledován přírůstek nebo úbytek absorbance (492 nm) při použití sekundární protilátky anti-c-myc/hPx. (Rozsah koncentrací scFv a Fab fragmentů se liší.)

Z grafu byly určeny hodnoty, kdy je signál poloviční proti maximální hodnotě a odpovídající koncentrace kompetujících scFv, resp. Fab v těchto bodech, které pak byly porovnány s koncentracemi konstantního Fab, resp. scFv fragmentu. Podíl koncentrace kompetitoru scFv ku konstantní koncentraci Fab vyjadřuje kolikrát větší koncentrace scFv byla zapotřebí k zvýšení signálu na polovinu maximální hodnoty; a obráceně, podíl koncentrace kompetitoru Fab ku konstantní koncentraci scFv vyjadřuje kolikrát menší koncentrace Fab byla zapotřebí k snížení signálu na polovinu maximální hodnoty. Zjištěné hodnoty, 8,2 krát, resp. 4,1 krát, jsou v souladu s literárními údaji (20, 93, 213-215), které uvádějí pro podíl vazebných konstant scFv a Fab rozmezí 1-10 ve prospěch Fab fragmentu. Pouze ve výjimečných případech byla vazebná konstanta scFv lepší než u Fab fragmentu (216).

5.7.2.5 Izotermální titrační kalorimetrie (ITC) a Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

Izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry–ITC) a diferenciální skenovací kalorimetrie (differential scanning calorimetry–DSC) umožňují získat pro interakce typu protein–ligand nebo protein–protein fyzikální veličiny, jako jsou ΔG (změna Gibbsovy energie), ΔH (změna enthalpie), ΔS (změna entropie), Δc_p (změna tepelné kapacity při konstantním tlaku), n (stechiometrie reakce), K_d (disociační konstanta), protonový transfer (H^+) či T_m (teplota tání). Při ITC se měří teplotní rozdíl ΔT mezi referenční a vzorkovou celou po přidání ligandu do vzorkové cely pomocí automatické byrety. Při DSC se měří ΔC_p mezi referenční a vzorkovou celou při změně teploty.

Pro důkladnou charakterizaci vazby tří rekombinantních fragmentů odvozených z mAb M75 byly použity obě metody: ITC i DSC. Některá data získaná z ITC byla publikována jako součást publikace popisující strukturní a termodynamické charakteristiky vazby protilátky M75 k antigenu (209).

Pomocí ITC a DSC byly porovnány scFv fragmenty s oběma orientacemi domén při shodné délce linkeru 20 aminokyselinových zbytků, H-20-L (p709) a L-20-H (p739), s cílem zjistit, má-li orientace domén v jinak identických konstruktech scFv M75 nějaký zásadní význam na vazbu antigenu. K měření bylo namísto celého proteinového antigenu použito minimálního epitopového peptidu K (DLPGEEDLPGEE).

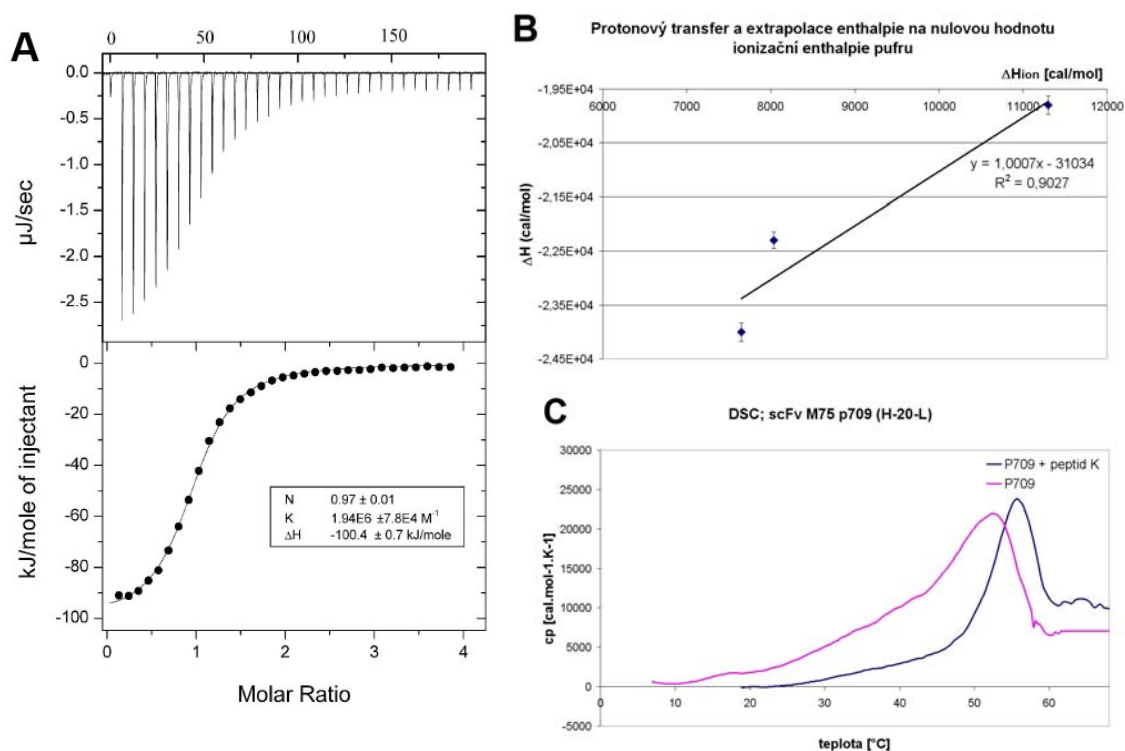
Jak ukazuje shrnující tab. 3 nebyly v daných podmínkách pozorovány významné rozdíly a aktivita a stabilita obou scFv fragmentů byla téměř identická.

Protonový transfer u scFv fragmentů s oběma orientacemi měl podle ITC měření hodnotu +1, dochází tedy v průběhu vazby antigenu a protilátky k odebrání jednoho H^+ z roztoku. Pravděpodobně je využit k protonaci jednoho ze dvou argininových zbytků ve variabilní doméně těžkého řetězce (Arg 50, Arg 52) ve vazebném místě protilátky M75 (přesněji v CDR-H2 těžkého řetězce). Jak vyplývá z 3D-struktury komplexu Fab M75 (209) a epitopového peptidu M, tyto aminokyselinové zbytky se zásadní měrou podílí na vazbě antigenu.

ITC byla též použita k charakterizaci vazebné schopnosti diabody formy scFv H-5-L (p714). Jak již bylo diskutováno v kapitole 5.7.2.2, nechová se M75 „diabody“ standardně, a zkrácení linkeru na 10, resp. 5 aminokyselinových zbytků nevede v neutrálním pH k spontánní dimerizaci; tu lze pozorovat pouze v zásadité oblasti pH a za přítomnosti antigenu. Z měření ITC při pH 8,4 vyplynuly pro scFv H-5-L hodnoty

Ka či ΔG blízké hodnotám zjištěným pro monomerní scFv H-20-L nebo L-20-H, avšak pro stechiometrii reakce (n) byla stanovena hodnota 0,5. To naznačuje, že dvě molekuly scFv M75 H-5-L (p714) vytvářející diabody váží pouze jeden epitopový peptid a diabody tedy pravděpodobně obsahuje pouze jedno vazebné místo.

Za použitím metody DSC byla snaha doplnit a ověřit výsledky získané z ITC. Podařilo se určit teplotu tání (T_m) jednotlivých fragmentů scFv a T_m komplexu jednotlivých scFv s epitopovým peptidem. Teplota tání pro protilátku v komplexu s antigenem se oproti samotné protilátce zvýšila o cca 3 °C, což dokumentuje stabilizaci protilátky vazbou antigenu. Toto bylo pozorováno a publikováno i pro jiné protilátky (217, 218). Ze záznamu se ovšem nepodařilo odečíst ΔC_p denaturovaného proteinu a tudíž nebylo možné získat další veličiny.



Obrázek 52: ITC a DSC analýza. A) Ukázka záznamu z ITC měření síly vazby mezi scFv M75 H-20-L (p709) a epitopovým peptidem K. Z hodnot získaných programem Origin 7 je možné určit stechiometrii, vazebnou konstantu a ΔH_{app} (zdánlivou). B) Extrapolace na nulovou hodnotu ionizační enthalpie ΔH_{ion} , kterou je potřeba odečíst od ΔH_{app} pro určení skutečné ΔH reakce. Směrnice přímky určuje protonový transfer H^+ . C) Záznam z DSC pro scFv M75 H-20-L (p709) samotný a v komplexu s epitopovým peptidem K. Je patrná stabilizace scFv M75 epitopovým peptidem.

	p709	p739	p714
ΔG [kJ/mol]	-36,4	-35,9	-33
ΔH [kJ/mol]	-133	-112	-132
$-T\Delta S$ [kJ/mol]	97	76,1	99
K_a [M^{-1}]	$2,4 \times 10^6$	$1,94 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$
H^+	0,95	1,2	1,05
ΔC_p [J/mol.K]	-669	n.d.	n.d.
T_m scFv [°C]	52,29	51	n.d.
T_m scFv +PK [°C]	55,96	54,5	n.d.

Tabulka 3: Souhrn dat získaných pomocí metod ITC a DSC pro tři scFv fragmenty odvozené z mAb M75 (p709, H-20-L; p739, L-20-H; p714, H-5-L); n.d. = nebylo stanoveno.

Údaje získané metodou ITC byly použity a diskutovány v naší práci (209), kde jsou jednou ze tří (ITC, rentgenostrukturní analýza, simulace molekulové dynamiky, MD) součástí informace získané o vazbě epitopového peptidu na scFv a Fab fragmenty M75.

Celkovou energii vazby antigenu (peptid K) protilátkou (scFv M75) získanou metodou ITC je možné rozdělit na enthalpický a entropický příspěvek. Pomocí MD simulací je možné rozdělit celkovou energii vazby na elektrostatické energetické příspěvky, včetně energie vodíkových vazeb, a energii pocházející z van der Waalsových interakcí (hydrofobní interakce). Výsledky naznačují, že oba typy interakcí jsou důležité pro vazbu antigenu. Data získaná z rentgenostrukturní analýzy ukazují, že elektrostatické interakce s dlouhým dosahem, které jsou nejsilnější mezi aminokyselinami ArgH50, ArgH52 a GluP5 (pozice argininu v těžkém řetězci protilátky a pozice glutamové kyseliny v epitopovém peptidu), jsou odpovědné za rozpoznání antigenu. Toto pravděpodobně vysvětluje neochotu tvorby komplexu antigen-protilátka v prostředí s kyselým pH. Důležitým faktorem stabilizujícím vytvořený komplex jsou van der Waalsovy interakce s krátkým dosahem mezi protilátkou a aminokyselinami z antigenu (ProP2, LeuP7, ProP8). Protonace karboxylových skupin v epitopu (v kyselém prostředí) vede ke ztrátě klíčové elektrostatické interakce mezi pozitivně nabitým vazebným místem protilátky a epitopem. Stejně závěry platí pro interakci mezi lehkým řetězcem protilátky a epitopem skrze aminokyseliny LysL55 a AspP6.

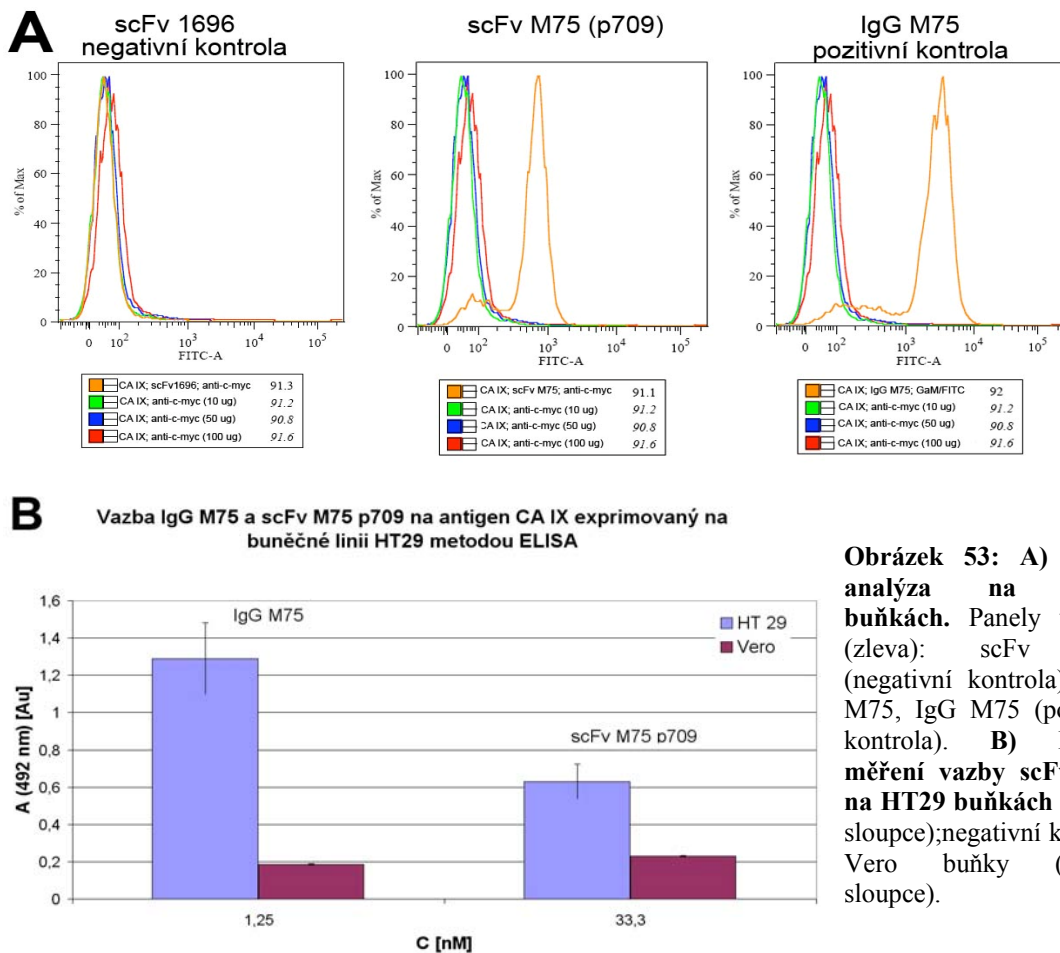
Pro systém antigen CA IX a mAb M75 byla vyřešena 3D-struktura bez antigenu a s navázaným antigenem. Byla provedena ITC měření dávající informace o termodynamických parametrech vzniku komplexu. Na základě znalosti 3D-struktury byly pomocí metod MD simulací určeny energetické příspěvky jednotlivých složek

komplexu a následně detailně určeny příspěvky jednotlivých aminokyselin vazebného místa protilátky. Tento aparát do budoucna umožňuje racionální design rekombinantních fragmentů protilátek s vyšší afinitou.

5.7.2.6 Testování aktivity scFv M75 na buněčné linii HT29

Funkčnost rekombinantního fragmentu scFv M75 (p709) a specifita jeho vazby k antigenu byla ověřena i v kontextu celých buněk HT29, které na povrchu exprimují karbonickou anhydrazu CA IX. Jako negativní kontrola byly použity buňky Vero.

Vazba byla sledována pomocí dvou metod: FACS analýza (obr 53A) ukázala pro scFv signál srovnatelný s rodičovským IgG M75, zatímco scFv fragment odvozený od irelevantní protilátky mAb 1696 se podle očekávání na buňky HT29 nevázal.

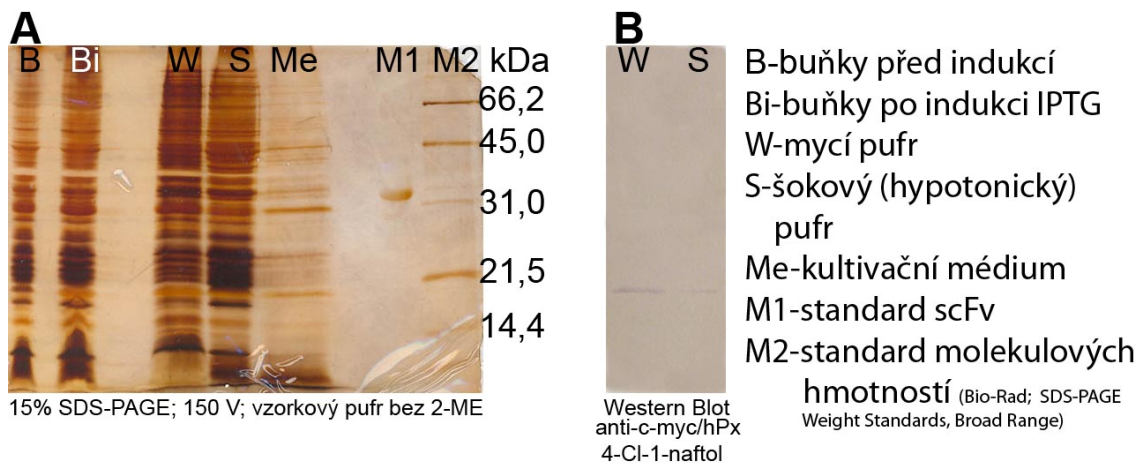


Obrázek 53: A) FACS analýza na HT29 buňkách. Panely ukazují (zleva): scFv 1696 (negativní kontrola), scFv M75, IgG M75 (pozitivní kontrola). B) ELISA měření vazby scFv M75 na HT29 buňkách (modré sloupce); negativní kontrola Vero buňky (fialové sloupce).

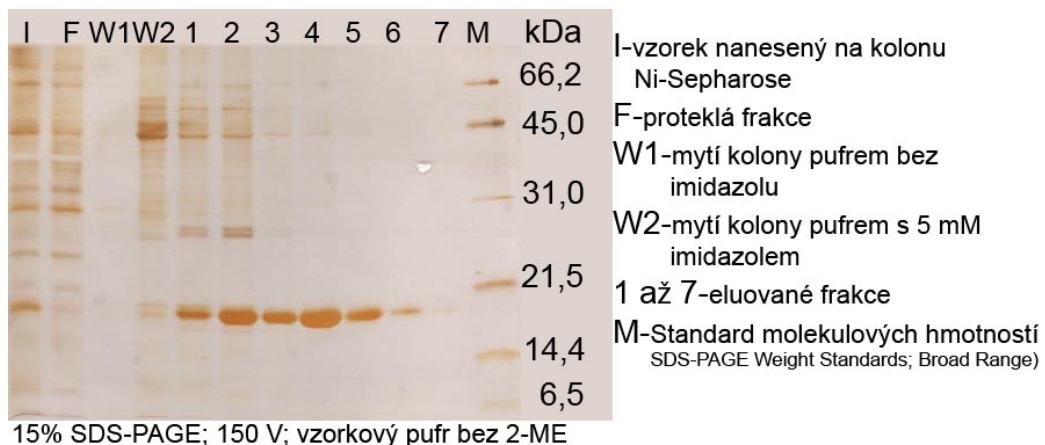
ELISA stanovení na živých buňkách (viz kap. 4.2.12) rovněž potvrdilo specifickou vazbu fragmentu scFv M75 k HT29 buňkám exprimujícím CA IX antigen (obr. 53B).

5.7.2.7 Kamelid M75

Z 3D-struktury Fab M75 s epitopovým peptidem vyplynulo, že asi 80% vazebných interakcí protilátky s antigenem připadá na V_H -doménu těžkého řetězce. Proto byla rekombinantně připravena samotná V_H -doména, připomínající variabilní doménu tzv. kamelidů, což jsou protilátky obsahující pouze těžký řetězec (34, 35). Tento rekombinantní fragment s molekulovou hmotností cca 15 kDa se lišil od „pravých“ kamelidů tím, že neměl odpovídající aminokyseliny ve 4 pozicích, které jsou v kamelidech konzervované a zřejmě jsou klíčové pro dobrou rozpustnost a aktivitu těchto protilátek (viz kap. 2.3). Přes tento nedostatek byl „camelide-like“ fragment protilátky v periplasmatickém prostoru bakterie *E. coli* rozpustný a dal se izolovat a purifikovat.



Obrázek 54: Produkce „camelide-like“ fragmentu M75 do periplasmatického prostoru. A) 15% SDS-PAGE; vzorkový pufr bez 2-ME (neredukující); B) Western Blot dokazující přítomnost rozpustného „camelide-like“ fragmentu v drahách označených W a S na obrázku A.



Obrázek 55: Purifikace „camelide-like“ fragmentu M75 na afinitním nosiči Ni-CAM HC Resin; 15% SDS-PAGE.

Aktivita tohoto fragmentu však byla pomocí Western Blotu nezjistitelná a taktéž ELISA byla negativní. Proto byla jeho případná vazebná aktivita testována pomocí mnohem citlivějšího kompetitivního měření fluorescence při vazbě epitopového peptidu K (DLPGEEDLPGEE) (190) s navázanou fluorescenční značkou (dansyl chloridem, DNSCl) v přítomnosti rostoucích koncentrací neznačeného peptidu. Měření spočívalo v tom, že k fragmentu scFv nebo „kamelidu“ byl přidán značený peptid v ekvimolárním poměru. Tato směs byla titrována kompetujícím neznačeným peptidem v rozsahu koncentrací 0-100 μM , který nejprve vytěsnil značený peptid K z komplexu, což se projevilo zvýšením fluorescence (samotná bílkovina neposkytovala žádnou fluorescenci). Posléze docházelo s dalšími přídávky kompetitoru k poklesu fluorescence způsobené ředěním koncentrace fluoroforu. Rovnováha mezi značeným a neznačeným peptidem K byla pro scFv M75 p709 a „kamelid“ M75 dosažena při koncentraci peptidu K 0,5 μM , respektive 10 μM pro „kamelid“ M75. Tento zdánlivý vzrůst síly vazby lze vysvětlit jednak specifickou interakcí a jednak nespecifickou interakcí mezi peptidem a hydrofobním povrchem „obnažené“ V_{H} -domény.

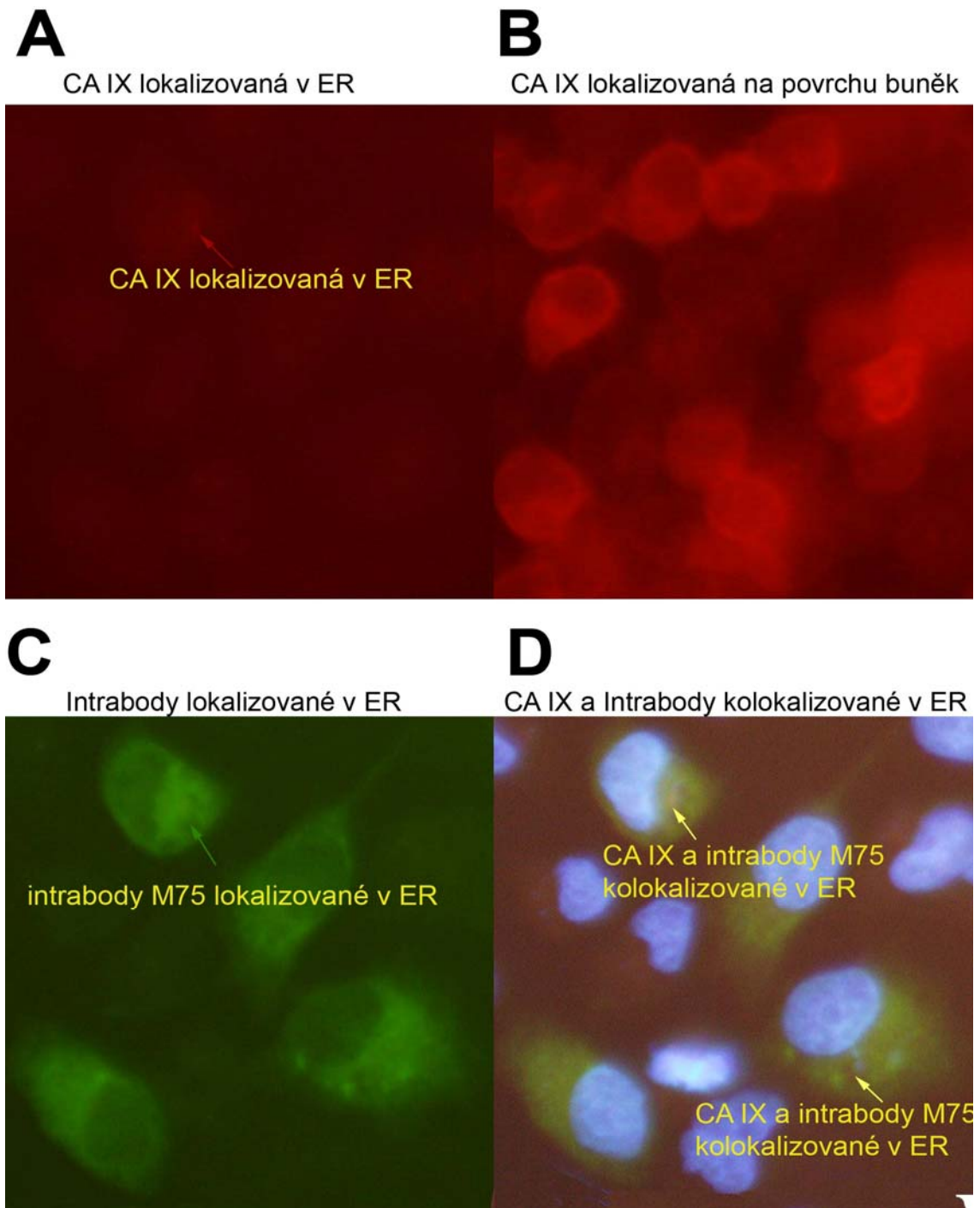
V dalších experimentech bude potřeba zavést do fragmentu ony 4 charakteristické mutace (34) a zjistit, zda jejich přítomnost povede k zlepšení vazebné aktivity „kamelidu“ rekombinantního fragmentu. To by poskytlo další potenciálně využitelnou variantu rekombinantního fragmentu M75 (205, 219).

5.7.2.8 Intrabody

Rekombinantní fragmenty protilátek lze konstruovat nejen pro použití in vitro, ale i tak, aby k jejich produkci docházelo přímo uvnitř buňky (tzv. „intrabody“). K tomu musí být expresní vektor opatřen signály, které směřují scFv fragment do požadovaného buněčného kompartmentu, místa jeho účinku. Tento koncept (220) byl popsán například u protilátky namířené proti povrchovému receptoru erbB2 (60), kde se scFv fragment a erbB2 protein, procházející sekreční drahou na buněčný povrch, „setkaly“ v endoplasmatickém retikulu (ER), a jejich vzájemná vazba měla za následek dramatický pokles koncentrace erbB2 receptoru na povrchu buněk. V analogii k tomuto „knock-down“ experimentu jsme proto upravili konstrukt scFv M75 pro expresi v ER (viz kap. 4.2.1.10), což vyžadovalo předřadit před vlastní scFv fragment signální peptid směřující proteinový produkt do sekreční dráhy a na C-konec produktu přidat retenční signál KDEL (60). Po transfekci (s pomocí dr. J. Turečkové, ÚMG AV ČR, v.v.i) takto

modifikovaného expresního vektoru pcDNA3 do buněk exprimujících na povrchu CA IX, např. nádorových buněk HT 29, by mělo v ER dojít k interakci scFv M75 s nově syntetizovanou CA IX a tím k „umlčení“ její exprese na buněčném povrchu. Na tomto modelu by pak bylo možné sledovat vztah mezi nádorovým fenotypem buněk a přítomností CA IX na jejich povrchu.

Tento pokus se zdařil pouze částečně. Na obr. 56 je ukázán výsledek imunofluorescenční analýzy, která sice prokázala lokalizaci scFv M75 v ER (panel C), a jakýsi náznak kolokalizace scFv a CAIX v ER (panel D), nedošlo však k výraznému snížení signálu CA IX na buněčném povrchu (panel B). Hlavním problémem byla nízká účinnost transfekce nádorové buněčné linie HT 29 vektorem pcDNA3 nesoucím gen pro intrabody M75. Tento problém se ukázal jako nejvíce limitující pro jednoznačnější určení funkčnosti našeho konstruktu scFv M75 pro intracelulární expresi a jejího vlivu na snížení exprese CA IX na povrchu nádorových buněk touto cestou.



Obrázek 56: Intracelulární exprese scFv M75: vliv na expresi CA IX sledovaný pomocí fluorescenční mikroskopie. Buňky HT29 (v HMEM+10%FCS+0.03%glutamin, 100 U/ml PNC a 100µg/ml Strep., 0.1%NaHCO₃) byly transfekovány elektroporací (Kit R, Nucleofector Amaxa II) vektorem pcDNA3 nesoucím intrabody M75 a pěstovány na mikroskopických sklíčkách. Po dvou dnech byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem a A, C permeabilizovány směsí 1:1 methanol/aceton a promyty PBS s 0,02% Tween, barveny příslušnou protilátkou a sledovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81 (Olympus).

A) Lokalizace CA IX v ER barveno postupně protilátkou V-10 a RAM/Cy3. **B) přirozená lokalizace CA IX na povrchu buněčné linie HT29** (barveno protilátkou V-10 a RAM/Cy3). **C) Lokalizace intrabody M75 v ER** (barveno protilátkou anti-c-myc/FITC). **D) Kolokalizace signálu pro intrabody M75 a CAIX z ER** (merge C a A, modrou barvou jádra). Obarveno a vyfotografováno dr. J. Turečkovou.

5.7.3 Rekombinantní fragment odvozený z mAb F11.2.32

Myší monoklonální protilátka F11.2.32 (IgG1) je namířena proti antigenu HIV-1 protease (221). Funkcí retrovirové proteasy HIV v životním cyklu viru je specifické proteolytické štěpení virových Gag a Gag/Pol polyproteinových prekursorů strukturních proteinů (matrix, kapsid a nukleokapsid) a tří virových enzymů včetně HIV proteasy samé (222). Inhibice HIV-1 proteasy brání maturaci virionu do infekční formy viru. Proteasa HIV-1 je funkční ve formě homodimeru, přičemž monomerní jednotka je složena z 99 AMK a obsahuje vysoce konzervovanou sekvenci tří aminokyselin Asp-Thr-Gly charakteristickou pro katalytické jádro aspartátových proteas (223, 224). Dvě podjednotky aktivního dimeru proteasy HIV jsou drženy pohromadě převážně interakcemi mezi čtyřmi konci polypeptidových řetězců, tj. dvěma N-konci (aminokyseliny 1-4) a dvěma C-konci (aminokyseliny 96-99) cit. (225).

Z těchto poznatků vyplývá, že retrovirová proteasa HIV je výborný cíl terapeutického zásahu. V současné době je schváleno a používáno 9 léků na bázi inhibitorů HIV proteasy, které se váží do aktivního místa proteasy a brání vazbě přirozeného substrátu. Hlavním problémem limitujícím stále a úspěšné používání těchto léků je vysoká frekvence mutací v HIV protease, jež jsou základem rezistence k inhibitorům a snižují tak účinnost léčiv (typicky i za vývoje křížové rezistence k vícero inhibitorům). Návrh nových inhibitorů účinkujících mimo aktivní místo HIV proteasy se zdá být vhodnou alternativní cestou. Pro návrh vhodných inhibitorů, účinkujících mimo aktivní místo, chybí ovšem přirozený templát. Ukazuje se, že vhodným templátem by mohli být mAb, které blokují funkci HIV proteasy. Řezáčová et al. (172) charakterizovali dvě vhodné mAb 1696 a F11.2.32. Vazba mAb 1696 na epitop v N-konci polypeptidového řetězce proteasy blokuje dimerizaci a tím i tvorbu aktivního homodimeru HIV-1 proteasy (226). MAb F11.2.32 se váže na epitop v oblasti chlopní v poloze 36 až 46. Tyto chlopně (z každého monomeru jedna) jsou velmi flexibilní a po vazbě substrátu zakryjí aktivní místo proteasy s navázaným substrátem a umožní tak vytvoření hydrofobního prostředí v průběhu proteolýzy (172). Jak naznačuje práce Bartoňová et al. (227), mechanismus působení mAb F11.2.32 není jen v distorzi chlopní, kryjících aktivní místo, ale poněkud překvapivě také v bránění vzniku funkčního homodimeru HIV proteasy.

Klonování cDNA molekul kódující těžkou a lehkou variabilní doménu protilátky F11.2.32 bylo již popsáno v práci z roku 1996 (221). Odpovídající aminokyselinová sekvence těžké (modře) a lehké (červeně) variabilní domény fragmentu scFv F11.2.32, zde s 15 aminokyselinových zbytků dlouhým linkerem (fialově), a s podtrženými CDR úseky zodpovědnými za vazebnou specifitu, je uvedena níže.

MDIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDYYGKSFMNWFQOKPGQPPKLLIYAASNQ
GSGVPARFSGSGSGTDFSLHIHPMEEDDSAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK

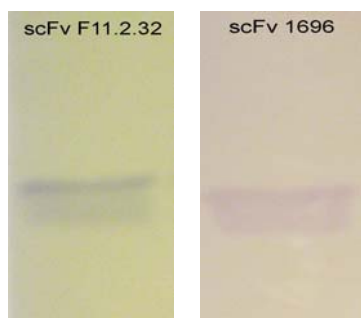
GGGGSGGGGSGGGGS

EVQLQESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFMRFGMHWRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIY
YADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTALYYCARSGGIERYDGTYYVMDYWGQG
 TSVTVSS

5.7.3.1 Renaturace a aktivita scFv fragmentu F11.2.32

Práce Bartoňové et al. (227) ukazuje, že protilátky inhibující HIV-1 proteasu divokého typu inhibují i varianty HIV-1 proteasy rezistentní k inhibitorům aktivního místa. Ke stanovení inhibičních konstant jednotlivých protilátek byly v práci (227) použity jejich rekombinantní formy, scFv fragmenty. Pro scFv fragment odvozený od mAb 1696 byl v naší laboratoři již dříve vyvinut protokol pro expresi, renaturaci a purifikaci (226). Naproti tomu četné dřívější pokusy získat scFv fragment odvozený od mAb F11.2.32 stejným postupem nevedly k cíli. Snaha o produkci scFv fragmentu v rozpustné formě v periplasmatickém prostoru nebyla úspěšná, protože scFv fragment přecházel výrazně do periplasmatických inkluzí. Z tohoto důvodu byl speciálně pro takto akumulovaný scFv fragment vyvinut renaturační protokol vycházející z práce (184) a popsáný zde v kap. 4.2.3.4.

MAb F11.2.32 rozpoznává sekvenční epitop, a tak bylo testování vazebné aktivity renaturovaného scFv fragmentu F11.2.32 před inhibičními studiemi provedeno metodou Western Blot s následnou imunodetekcí, kde jako antigen byla použita HIV-1 proteasa. Jako primární protilátka byl použit scFv fragment F11.2.32 a sekundární protilátka anti-c-myc/hP α (klon 9E10) (obr. 57).



Obrázek 57: Testování aktivity scFv fragmentu F11.2.32. ScFv 1696 sloužil jako pozitivní kontrola. Použité množství antigenu HIV-1 proteasy pro jednotlivé fragmenty bylo stejné a koncentrace jednotlivých scFv byla rovněž stejná (500 nM).

5.7.4 Rekombinantní fragmenty odvozené z mAb MEM97

Myší monoklonální protilátka MEM97 (IgG1) je namířena proti antigenu CD20 (228). Jedná se o neglykosylovaný transmembránový fosfoprotein o velikosti 33 až 37 kDa se čtyřmi transmembránovými doménami, který se nachází ve všech vývojových stádiích B-lymfocytů od pre-B-lymfocytů až po zralé B-lymfocyty a prakticky na všech B-buněčných lymfomech dochází ke zvýšené expresi tohoto receptoru (229). Zcela chybí na plasmatických a hematopoetických kmenových buňkách. Buňky, na kterých se tento antigen nachází, ho po vazbě protilátky neodvrhují ani neinternalizují, a proto se tento povrchový znak stává prototypem antigenu vhodného pro terapii založenou na protilátkách (229-233).

Přesná *in vivo* funkce CD20 je stále nejasná (zdá se, že by mohl hrát roli při transportu Ca²⁺ iontů (1)). Knockout myši bez tohoto receptoru nevykazují žádné zjevné fenotypové a imunologické abnormality (232, 234). Není znám ani fyziologický ligand k tomuto receptoru a není známa ani 3D-struktura (230). V PDB databázi je pouze model tohoto receptoru (1S8B).

V současné době je na trhu několik léčiv namířených proti povrchovému znaku CD20, které se používají v klinické praxi, např. rituximab (anti-CD20 chimerická monoklonální protilátka), jehož mechanismus účinku není zcela objasněn, ale zdá se, že působí na B-lymfocyty jak komplement-dependentní cytotoxicitou (CDC), tak mechanismem buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách (ADCC) (230). Používají se

též radioimunokonjugáty ibritumomab tiuxetan – Zevalin (s izotopem Y-90) a tositumomab - Bexxar (s izotopem I-131) (235).

Nemocí, u kterých se využívá protilátek namířených proti znaku CD20, je celá řada, například B-buněčný non-Hodgkinův lymfom (236), revmatoidní artritida (234, 237), folikulární lymfom (230), systémový lupus erythematosus (238) či primární Sjögrenův syndrom (239). Existují též studie s využitím léku rituximab jako podpůrného imunosupresivního léčiva při transplantacích (240). U některých se již protilátky používají v klinické praxi, u jiných je vývoj ve fázi klinických studií II či III.

Teprve nedávno publikovaná strukturně-biologická práce (241) uvádí krystalovou strukturu Fab fragmentu odvozeného z protilátky rituximab a cyklického epitopového peptidu odvozeného z extracelulární smyčky proteinu CD20 o aminokyselinové sekvenci NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ.

V Centru cílených terapeutik, jehož je naše laboratoř spoluúčastníkem, je úkolem vytvořit nebo alespoň připravit technologii na přípravu léčiv na základě konjugátů monoklonálních protilátek a jejich fragmentů s některým z vhodných radioizotopů či cytotoxických molekul. Jako vhodná monoklonální protilátka (hlavně co se dostupnosti a patentů týče) byla vybrána myší monoklonální protilátka MEM97. Nevýhodou této protilátky je, že její epitop je strukturní, čímž je znemožněno použití metody Western Blot (tato metoda většinou vyžaduje protilátky rozpoznávající sekvenční epitop) a v současnosti se dá její aktivita testovat pouze metodou ELISA či fluorescenční cytometrií (FACS) na celých buňkách, neboť nebyl dosud připraven vhodný rekombinantní protein CD20 (výše zmíněný strukturní epitop pro rituximab nemusí nutně souhlasit se strukturním epitopem pro MEM97, bude však vyzkoušen).

Konstrukce scFv a dalších fragmentů mAb MEM97 z buněk příslušného hybridomu je podrobně popsána v Metodách (kap. 4.2.1). Odpovídající aminokyselinová sekvence těžké (modře) a lehké (červeně) variabilní domény fragmentu scFv MEM97, zde s 15 aminokyselinových zbytků dlouhým linkerem (fialově), a s podtrženými CDR úseky zodpovědnými za vazebnou specifitu, je uvedena níže.

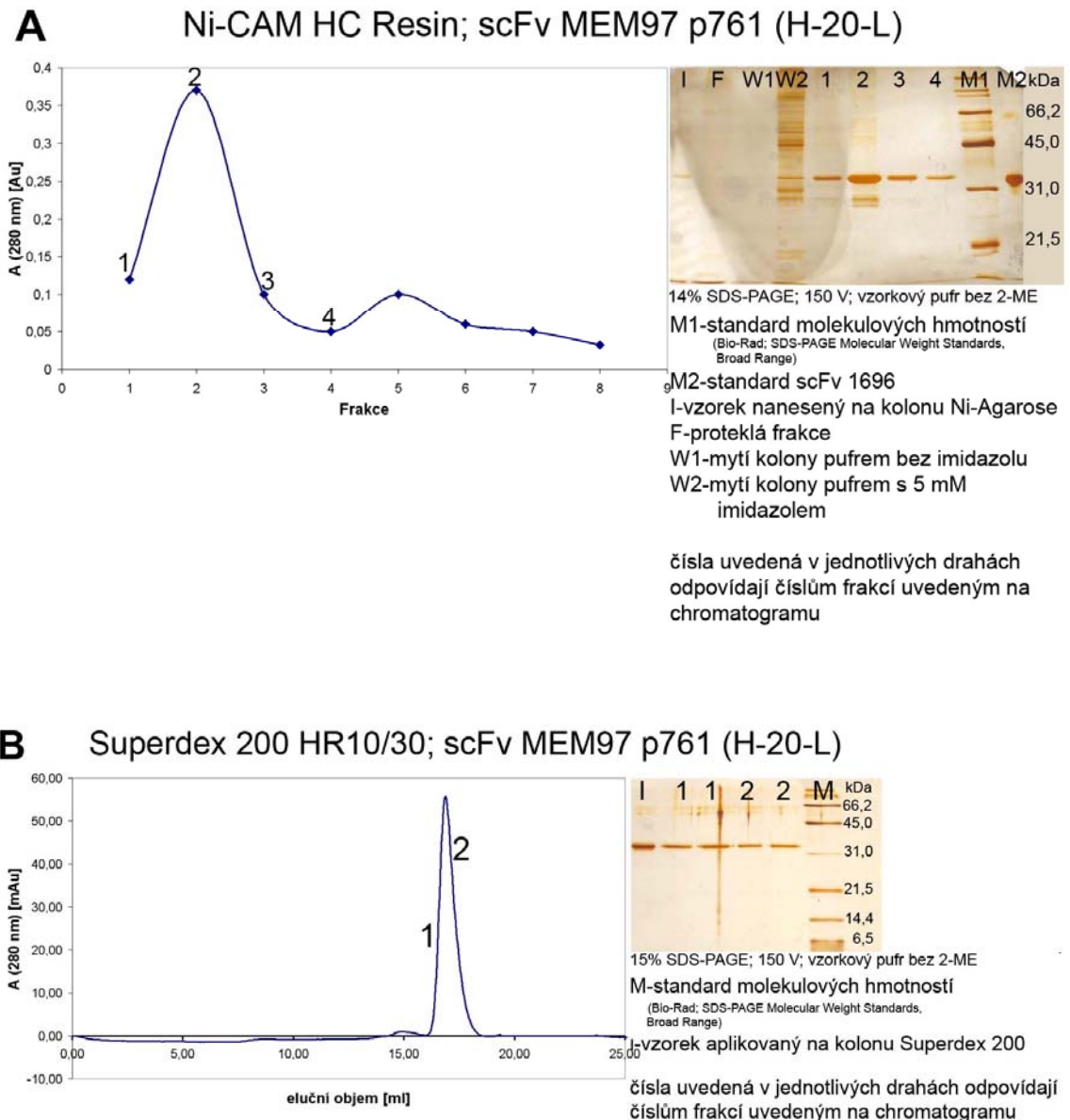
MDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRPSGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGV
PSRFSGSGSGTQFSLKINRLQPEDFGNYYCQHFWSSTPWF~~GGG~~GTKLEIKR

GGGGSGGGSGGGGS

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNIHWVKQTPGQGLEWIGAIYPENGDT
YNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWGYGNYGAMDYWGQGT
VTVSS

5.7.4.1 Purifikace

Rekombinantní fragmenty odvozené od mAb MEM97 byly všechny připraveny s His₅-kotvou, která umožňuje poměrně snadně v jednom kroku získat scFv fragment o 80 až 95% čistotě, co se týče kontaminujících proteinů. Nedojde ovšem k odstranění multimerních forem scFv. Pro jednoduché testování aktivity (FACS) námi připravených rekombinantních fragmentů protilátek je tato čistota dostačující a nebylo potřeba dalších purifikačních kroků jako tomu bylo v případě rekombinantních fragmentů M75. Při purifikaci scFv MEM97 exprimovaných v bakteriích *E. coli* se dařilo získat standardně 2 mg takto čistého proteinu na 1 litr bakteriální kultury. V některých případech následovala jako finální purifikační krok po chromatografii na Ni-CAM HC Resin gelová filtrace na Superdex 200 HR10/30.



Obrázek 58: Purifikace scFv MEM97 fragmentů s histidinovou kotvou produkovaných do periplasmatického prostoru. A) afinitní chromatografie na Ni-CAM HC Resin. B) gelová filtrace na Superdex 200 HR10/30.

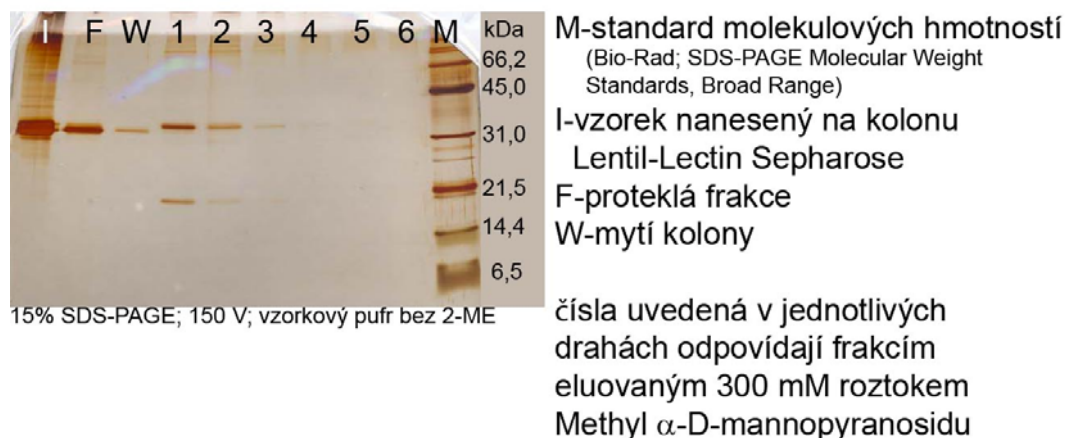
5.7.4.2 Glykosylace rekombinantního fragmentu scFv MEM97

Pro některé způsoby derivatizace protilátek a jejich rekombinantních fragmentů se využívají oligosacharidové zbytky, které jsou k proteinu připojeny N-glykosidickou vazbou. Celé molekuly IgG jsou přirozeně glykosylované v konstantní doméně CH₂, v případě scFv fragmentu však přirozený glykosylační signál chybí. V našich scFv konstruktech je však N-glykosylační signál (N-X-S(T); X není Pro) přítomen na C-konci mezi *myc* značkou (pro detekci proteinů pomocí monoklonální anti-c-myc protilátky) a His₅ kotvou (pro purifikaci na afinitní chromatografii):

EQKLISEEDLNGTTHHHHH, takže ve vhodném eukaryotním expresním systému by mohla vznikat glykosylovaná forma scFv fragmentu. Jako optimální, vzhledem k dostupnosti technologie, se jevil expresní systém v hmyzích S2 buňkách (odvozených z buněk *Drosophila melanogaster*) v kombinaci s komerčním vektorem pMT/BiP/V-5 His (Invitrogen) nesoucím BiP signální sekvenci (MKLCILLAVVAFVGLSLG) pro sekreci heterologních proteinů do média.

Pro glykosylovanou formu rekombinantního fragmentu MEM97 (p768) exprimovanou v S2 buňkách byla po afinitní chromatografii s Ni-CAM HC Resin (výtěžek okolo 2,5 mg proteinu z 50 ml média) zařazena afinitní chromatografie na Lentil-Lectin Sepharose (Amersham Biosciences) pro oddělení glykosylované a neglykosylované formy scFv. Podařilo se tak získat čistý glykosylovaný scFv MEM97 o celkovém množství 0,3 až 0,6 mg glykosylovaného proteinu na 50 ml média. Jak ukazuje obr. 58, na koloně se zachytil a roztokem sacharidu je eluován protein migrující o něco pomaleji než proteklá frakce (srov. dráhy 1 a F, resp. W). K potvrzení, že se jedná o stejný protein, scFv MEM97, lišící se jen ne/přítomností sacharidové složky byla použita N-koncová aminokyselinová sekvence (laskavě provedl dr. Z. Vobúrka ÚOCHB AV ČR, v.v.i).

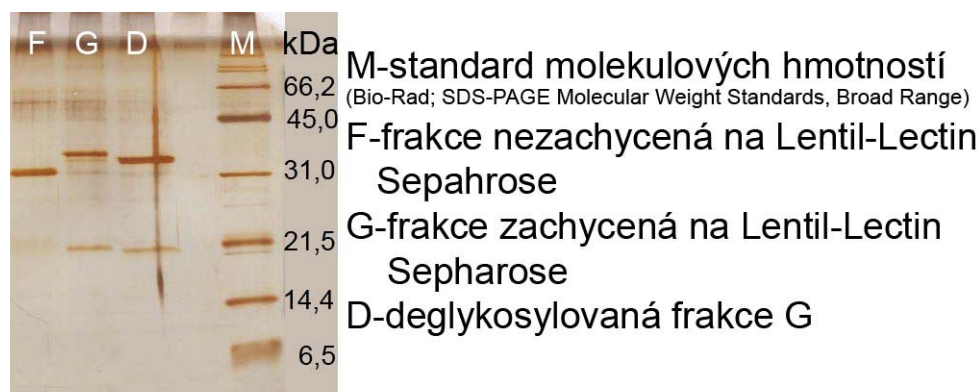
Lentil-lectin Sepharose (Amersham Biosciences)



Obrázek 59: Afinitní chromatografie scFv MEM97 (H-20-L; p768, produkováný S2 buňkami) na Lentil-lectin Sepharose.

Purifikačním krokem na Lentil-Lectin Sepharose byl získán čistý produkt, o němž se dalo předpokládat, že jde o glykosylovaný scFv MEM97. Pro průkaz glykosylace bylo použito enzymatického štěpení pomocí hydrolasy PNGase F, která odštěpuje N-glykosylové zbytky sacharidů z proteinu, čímž může dojít k poklesu velikosti

proteinu, pozorovatelnému na SDS-PAGE. Na obr. 60 je patrné, že materiál zachycený na Lentil-Lectin Sepharose (dráha G) se po působení enzymu zmenšil, migruje však stále poněkud pomaleji než neglykosylovaný scFv fragment (dráha F), což může být možná způsobeno přítomností O-glykosylace.



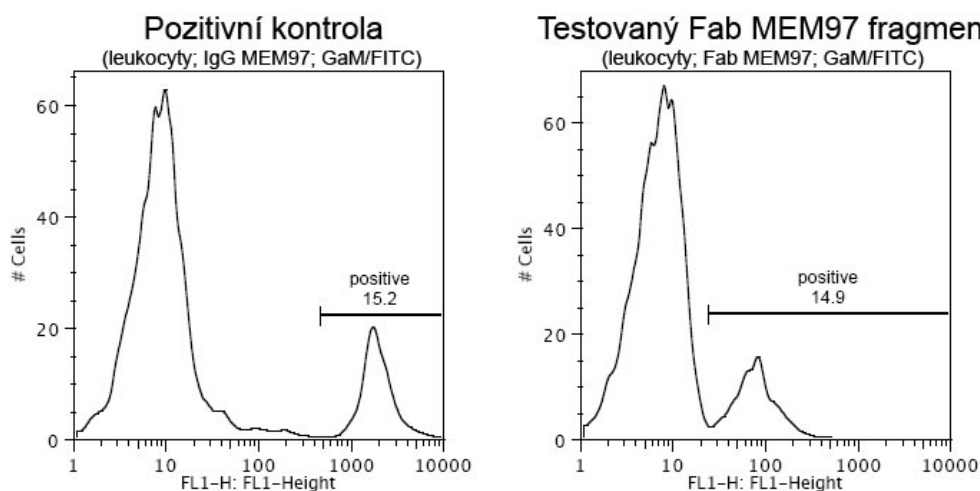
15% SDS-PAGE; 150 V; vzorkový pufr bez 2-ME

Obrázek 60: Potvrzení přítomnosti N-glykosylace na scFv MEM97 p768 (H-20-L) pomocí deglykosylace enzymem PNGase F. Glykosylovaná frakce G se po inkubaci s PNGase F zmenší (dráha D).

Uvedené výsledky ukazují, že v eukaryotním expresním systému dochází k N-glykosylaci s využitím signálu uměle vneseného poblíž C-konce scFv fragmentu; glykosylována je však pouze malá část produktu, a proto bude zapotřebí zařadit další, resp. jiné glykosylační místo. Vhodná by pro tento účel mohla být oblast linkeru spojující V_H a V_L doménu, neboť zde je nejmenší riziko interakce oligosacharidu s vazebným místem scFv.

5.7.4.3 Testování vazebné aktivity scFv fragmentů MEM97 pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (FACS)

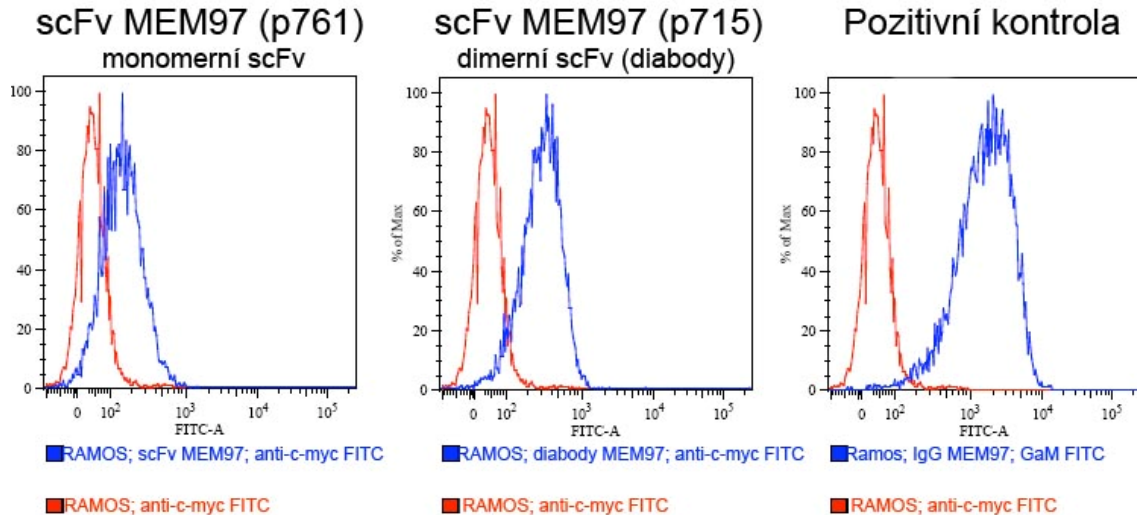
Jak již bylo zmíněno, mAb MEM97 rozpoznává strukturální epitop a jelikož se dosud nepodařilo připravit rekombinantně antigen CD20, bylo potřeba zvolit metodu, která může využít pro stanovení vazebné aktivity protilátek celých buněk. Jako vhodná metoda byla zvolena fluorescenční průtoková cytometrie (FACS). Měření byla provedena za pomoci dr. O. Horvátha z laboratoře prof. V. Hořejšího a dr. J. Rajnocha z firmy Exbio, a probíhala podle protokolu popsáném v kapitole 4.2.14. Prvním testovaným fragmentem byl Fab fragment připravený proteolytickým štěpením intaktního IgG MEM97, čímž byla potvrzena schopnost monovalentního fragmentu vázat dostatečně silně strukturální epitop na CD20 povrchovém antigenu (obr. 61).



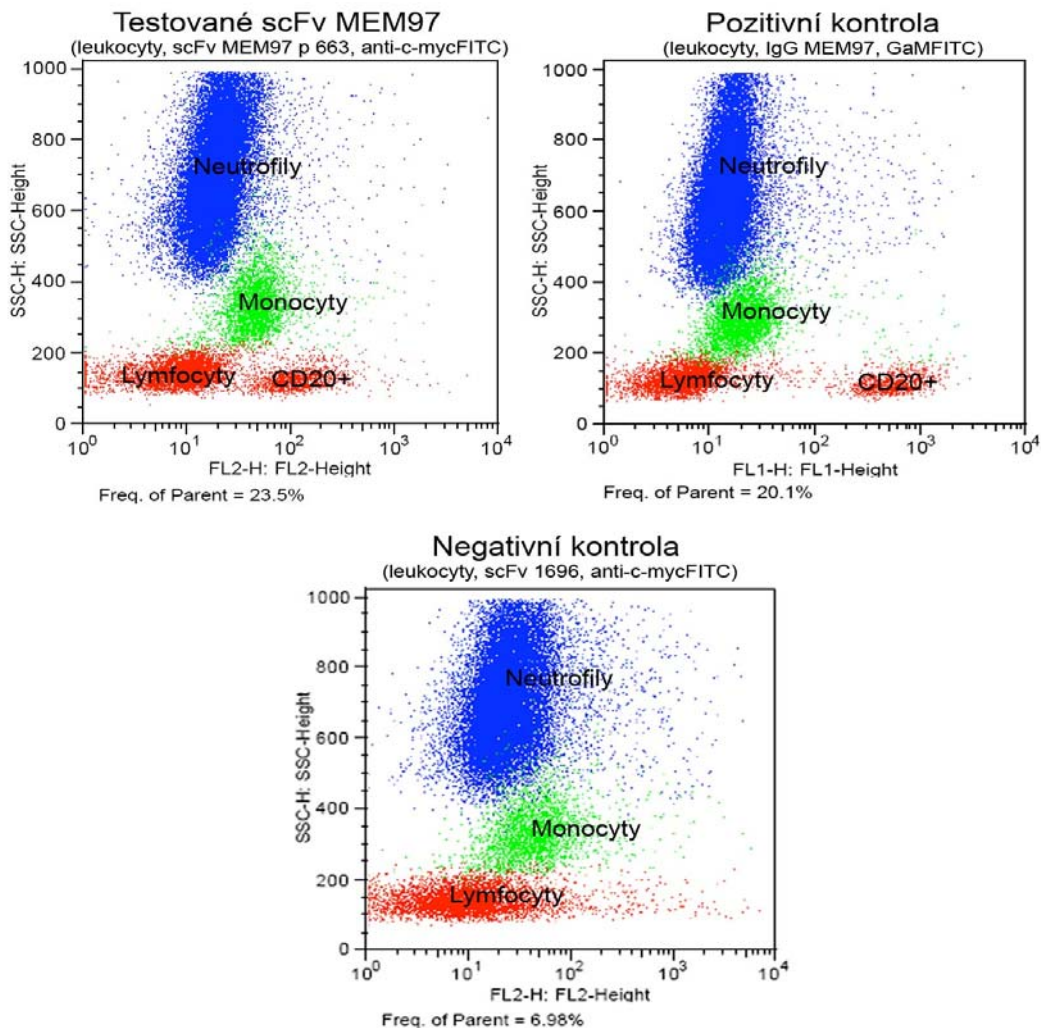
Obrázek 61: Průtoková cytometrie, fragment Fab MEM97. Provedeno ve spolupráci s dr. O. Horváthem, ÚMG AV ČR, v.v.i.

Testované fragmenty scFv MEM97 lze podle intenzity fluorescenčního signálu seřadit v následujícím pořadí od nejslabšího k nejsilnějšímu: L-15-H (p649) < H-20-L (p761) < L-10-H (p663) < L-5-H (p715).

Nejvyšší signál dává diabody ve formátu L-5-H, avšak pořadí konstruktů je jen kvalitativní, neboť se srovnává monomerní scFv (p649 a p761) proti scFv ve formě diabody (p663 a p715), která nese dvě vazebná místa pro sekundární protilátku, kdežto monomerní scFv má toto místo pouze jedno a tudíž i intenzita fluorescence je nižší. Porovnávat intenzitu fluorescence s pozitivní kontrolou IgG MEM97 je už zcela vyloučené, neboť zde je jako sekundární protilátka použito polyklonální sérum proti celému IgG MEM97 a tudíž není znám přesný počet molekul vážící se sekundární protilátce. Na přiložených obrázcích 62 a 63 je část záznamu z průtokového cytometru dokumentující aktivitu vybraných konstruktů.



Obrázek 62: Záznam z průtokové cytometrie na příkladu několika scFv MEM97 fragmentů: p761 (H-20-L) jako zástupce monomerního scFv a p715 (L-5-H) jako zástupce dimerního scFv. Provedeno na buňkách RAMOS ve spolupráci s dr. J. Rajnochem, Exbio.



Obrázek 63: Záznam z průtokové cytometrie. Některé scFv MEM97 fragmenty (zde pro ukázkou pouze p663 (L-10-H)) byly testovány přímo na B-lymfocytech periferní lidské krve. Na ose X log fluorescence došlo k označení populace B buněk nesoucí znak CD20. Provedeno ve spolupráci s dr. O. Horváthem, ÚMG AV ČR, v.v.i.

V rámci Centra cílených terapeutik byly rekombinantní fragmenty scFv odvozené od mAb MEM97 poskytnuty spoluřešitelskému pracovišti na Přírodovědecké fakultě UK (prof. K. Bezouška) k testování možnosti tvorby multimerních komplexů pomocí dendrimerů. Předběžné výsledky jsou povzbudivé (P. Pompach, osobní sdělení). Poskytnuty budou i na pracoviště ÚMCH AV ČR, v.v.i (prof. K. Ulbrich) pro přípravu konjugátů s polymery.

6 Závěr

Cílem této disertace bylo rozvinout v tuzemských podmínkách technologii přípravy rekombinantních fragmentů protilátek a ověřit celý postup na několika modelových monoklonálních protilátkách potenciálně využitelných v diagnostice a terapii.

Pro čtyři protilátky, mAb TU-20, M75, MEM97 a F11.2.32, byly zkonstruovány rekombinantní fragmenty v různých formátech (scFv fragmenty monovalentní i bivalentní, tzv. diabody; intrabody pro intracelulární expresi) a pro jejich heterologní expresi byly použity vektory umožňující expresi v *E. coli* (ve formě cytoplasmatických inkluzí, periplasmatických inkluzí a v rozpustné formě) a v hmyzích S2 buňkách (exprese glykosylovaných forem scFv fragmentů do média). V případě exprese proteinů v nerozpustné formě byly vyvinuty renaturační postupy pro získání aktivních forem scFv fragmentů.

Byl testován vliv délky linkeru $-(\text{Gly}_4\text{Ser})_x-$ (kde x je 1 až 4) spojujícího variabilní doménu lehkého a těžkého řetězce na vznik různých multimerních forem scFv. Jako optimální pro vznik pouze monomerního scFv fragmentu se ukázala délka 20 aminokyselin. ScFv s linkerem 15 aminokyselin dlouhým je směsí mono-, di- a trimerních forem scFv, jejichž zastoupení je závislé na koncentraci scFv v roztoku (se vzrůstající koncentrací vzrůstá množství násobných forem scFv, hlavně dimeru). Při délce linkeru 10 a 5 aminokyselin je rovnováha výrazně posunuta ve prospěch dimerní formy. Bylo ukázáno, že významnou roli při vzniku oligomerních forem hraje i sekvence variabilních domén.

K charakterizaci scFv fragmentů byly vedle „běžných“ postupů jako jsou ELISA, Western blot nebo průtoková cytometrie použity i pokročilejší fyzikálně-chemické metody ITC a DSC.

Jedním ze studovaných konstruktů byl i tzv. intrabody formát scFv fragmentu, který umožňuje intracelulární expresi a vazbu k antigenu uvnitř buňky a tím způsobuje pokles jeho koncentrace na povrchu buněk.

U scFv fragmentu odvozeného od monoklonální protilátky M75 byl testován i vliv vzájemné orientace V_H a V_L domén v scFv polypeptidu na stabilitu a vazebnou aktivitu. Bylo zjištěno, že orientace V_H-V_L vykazovala vyšší stabilitu, což se projevovalo zejména v průběhu purifikace, nicméně vazebná aktivita stanovená metodou ITC v optimálních podmínkách byla pro obě orientace velmi podobná.

7 Seznam použitých zkratk

2-ME: 2-Merkaptoethanol

Ab: protilátka (Antibody)

ADCC: buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)

AMK: aminokyselina

BCR: aktivační receptor B-lymfocytů

BSA: bovinní sérový albumin (Bovine Serum Albumine)

CA IX: karbonická anhydrasa IX

Camel Ig: typ imunoglobulinů typických pro velbloudy a lamy

CDC: komplement-dependentní cytotoxicita (Complement Dependent Cytotoxicity)

cDNA: deoxyribonukleová kyselina vzniklá z mRNA

CDR: oblasti určující komplementaritu (Complementarity Determining Region)

C_L: konstantní doména lehkého řetězce protilátky

COS buňky: opičí ledvinové buňky

Da, kDa: jednotka molekulové hmotnosti Dalton, kiloDalton

DNSCl: dansyl chlorid

DSC: diferenciální skenovací kalorimetrie (Differential Scanning Calotimetry)

dsFv: Fv fragment stabilizovaný disulfidovou vazbou (disulfide-stabilized Fv fragment)

EDTA: kyselina etylendiamintetraoctová

EGFR: receptor pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor)

ELISA: (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

ER: endoplasmatické retikulum

Fab, F(ab')₂: fragment vázající antigen

FACS: průtoková cytometrie (Fluorescent Activated Cell Sorting)

Fc: krystalizující fragment (Fragment crystal)

FDA: americký Úřad pro potraviny a léčiva (Food and Drug Administration)

FITC: fluorescein isothiokyanát

FR 1-4: framework 1-4

Fv: variabilní fragment (Fragment variable)

HAMA: lidská odpověď s tvorbou protilátek proti myším protilátkám (Human Anti Mouse Antibodies)

- H-řetězce: těžké řetězce protilátek
- hPx: křenová peroxidasa
- hsFv: Fv fragment stabilizovaný helixy (helix-stabilized Fv fragment)
- HuCAL: knihovna lidských genů pro protilátky (Human Combinatorial Antibody Libraries)
- HV oblast 1-4: hypervariabilní oblast 1-4
- C_H: konstantní domény těžkého řetězce protilátky
- CHO buňky: křeččí ovariární buňky
- IFN- γ : interferon γ
- IgA-IgM: třídy imunoglobulinů
- IgNAR: typ imunoglobulinů typických pro žraloky
- IL-10: interleukin 10
- IL-4: interleukin 4
- IMAC: afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography)
- IPTG: isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
- IT: inkluzní tělíska
- ITC: isotermální titrační kalorimetrie (Isothermal Titration Calorimetry)
- K_{as}: asociační konstanta
- K_{dis}: disociační konstanta
- LB médium/agar: Luria-Bertani médium/agar
- L-řetězce: lehké řetězce protilátek
- mAb: monoklonální protilátka (monoclonal Antibody)
- MD: molekulová dynamika
- NMR: nukleární magnetická resonance
- OPD: o-fenylendiamin dihydrochlorid
- PAGE: elektroforesa na polyakrylamidovém gelu (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
- PCR: polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
- PDB: internetová proteinová databanka (Protein Databank)
- PG doména: proteoglykanová doména
- PHN: paroxysmální noční hemoglobinurie (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria)
- PMSF : fenylmetylsulfonyl fluorid
- Psi: jednotka tlaku (Pounds per square inch)
- RAM: polyklonální králičí protilátka (Rabbit anti Mouse)

- RSV: respirační syncytiální virus (Respiratory Syncytial Virus)
- scFv: jednořetězcový variabilní fragment (single chain Fragment variable)
- SDR: specifitu určující aminokyselinové zbytky (Specificity Determining Residues)
- SDS: dodecylsírán sodný
- SIP display: druh fágového displaye (Selective Infection Phage display)
- SLS: N-lauroyl sarcosin
- SOE: zvláštní typ polymerasové řetězové reakce (Splicing by Overlapping Extension)
- TBR: vazebná místa pro antigeny (Target Binding Regions)
- TGF- β : tkáňový růstový faktor β
- TRD: doména bohatá na tyrosiny (Tyrosine Rich Domain)
- Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- VEGF: vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
- V_H: variabilní doména těžkého řetězce protilátky
- V_L: variabilní doména lehkého řetězce protilátky

8 Přílohy

scFv TU-20			
Konstrukt	p580	p625	p656
Orientace domén	VL-(G4S)3-VH-myc	peIB+VL-(G4S)3-VH-myc	peIB+VL-(G4S)2-VH-myc-His5
Způsob exprese	<i>E. coli</i> ; cytoplasmatické inkluze	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě
Aktivita	ELISA	ELISA	ELISA

scFv MEM97			
Konstrukt	p649	p663	p761
Orientace domén	peIB+VL-(G4S)3-VH-myc-His5	peIB+VL-(G4S)2-VH-myc-His5	peIB+VH-(G4S)4-VL-myc-His5
Způsob exprese	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě
Aktivita	FACS	FACS	FACS
Fab MEM97			
Konstrukt	p768	Fab MEM97	
Orientace domén	BIP+VH-(G4S)4-VL-myc-His5	VL-CLS-SCH1-VH	
Způsob exprese	<i>Drosophila</i> S2 buňky; produkce do média	hybridom MEM97; proteolytické štěpění papainem	
Aktivita		FACS	

scFv M75					
Konstrukt	p583	p615	p652	p697	p709
Orientace domén	VL-(G4S)3-VH-myc	VL-(G4S)3-VH-myc	peIB+VL-(G4S)3-VH-myc-His5	peIB+VH-(G4S)3-VL-myc-His5	peIB+VH-(G4S)4-VL-myc-His5
Způsob exprese	<i>E. coli</i> ; cytoplasmatické inkluze	<i>E. coli</i> ; cytoplasmatické inkluze	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě
Aktivita	Western Blot, ELISA	Western Blot, ELISA	Western Blot, ELISA	Western Blot, ELISA	Western Blot, ELISA, ITC/DSC, FACS
Konstrukt	p713	p714	p728	p739	p767
Orientace domén	peIB+VH-(G4S)2-VL-myc-His5	peIB+VH-(G4S)3-VL-myc-His5	leader- VH-(G4S)4-VL-myc-KDEL	peIB+VL-(G4S)4-VH-myc	peIB+VH-myc-His5
Způsob exprese	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě	produkce do ER savčích buněk	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě	<i>E. coli</i> ; rozpustný v periplasmě
Aktivita	ELISA	Western Blot, ELISA, ITC/DSC	Fluorescenční mikroskopie	Western Blot, ELISA, ITC/DSC	Fluorescence

scFv F11	
Konstrukt	p694
Orientace domén	peIB+VL-(G4S)3-VH-myc-His5
Způsob exprese	<i>E. coli</i> ; periplasmatické inkluze
Aktivita	Western Blot

9 Seznam publikací

Kral, V., P. Mader, R. Collard, M. Fabry, M. Horejsi, P. Rezacova, M. Kozisek, J. Zavada, J. Sedlacek, L. Rulisek, and J. Brynda. 2007. Stabilization of antibody structure upon association to a human carbonic anhydrase IX epitope studied by X-ray crystallography, microcalorimetry, and molecular dynamics simulations. *Proteins*. (Epub)

Svecova, H., V. Kleinova, D. Seifert, H. Chaloupkova, J. Baurle, K. Kranda, V. Kral, and M. Fiser. 2008. Radioiodination of mouse anti-III beta-tubulin antibodies and their evaluation with respect to their use as diagnostic agents for peripheral neuropathies. *Appl Radiat Isot* 66:310-316.

Bartonova, V., V. Kral, I. Sieglova, J. Brynda, M. Fabry, M. Horejsi, M. Kozisek, K. G. Saskova, J. Konvalinka, J. Sedlacek, and P. Rezacova. 2008. Potent inhibition of drug-resistant HIVprotease variants by monoclonal antibodies. *Antiviral therapy*. (In press)

10 Seznam použité literatury

1. Hořejší, V., and J. Bartůňková. 2005. *Základy Imunologie*. Triton s.r.o, Praha.
2. Goodman, J. W. 1991. Immunoglobulin Structure and Function. In *Basic and Clinical Immunology*, seventh ed. D. P. Stites, and I. T. Terr, eds. Appleton & Lange, East Norwalk.
3. Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 1996. *Immunology*. Times Mirror International Publishers Limited, London.
4. Hill, S. L., J. L. Mitchell, D. Burnett, and R. A. Stockley. 1998. IgG subclasses in the serum and sputum from patients with bronchiectasis. *Thorax* 53:463-468.
5. Beck, O. E., and P. E. Kaiser. 1981. Nephelometry of human IgG subclass concentration in serum. *Clin Chem* 27:310-313.
6. Wilson, M., E. Bengten, N. W. Miller, L. W. Clem, L. Du Pasquier, and G. W. Warr. 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4593-4597.
7. Kehry, M., S. Ewald, R. Douglas, C. Sibley, W. Raschke, D. Fambrough, and L. Hood. 1980. The immunoglobulin mu chains of membrane-bound and secreted IgM molecules differ in their C-terminal segments. *Cell* 21:393-406.
8. Padlan, E. A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31:169-217.
9. Molecular Probes web page.
10. Poljak, R. J., L. M. Amzel, H. P. Avey, B. L. Chen, R. P. Phizackerley, and F. Saul. 1973. Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:3305-3310.
11. Skerra, A. 2003. Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol* 7:683-693.
12. Wu, T. T., and E. A. Kabat. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132:211-250.
13. The biology project an online interactive resource for learning biology. University of Arizona
14. Tramontano, A., C. Chothia, and A. M. Lesk. 1990. Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. *J Mol Biol* 215:175-182.
15. Chothia, C., A. M. Lesk, A. Tramontano, M. Levitt, S. J. Smith-Gill, G. Air, S. Sheriff, E. A. Padlan, D. Davies, W. R. Tulip, and et al. 1989. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342:877-883.
16. Chothia, C., and A. M. Lesk. 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-917.
17. Tramontano, A., and A. M. Lesk. 1992. Common features of the conformations of antigen-binding loops in immunoglobulins and application to modeling loop conformations. *Proteins* 13:231-245.
18. Shirai, H., A. Kidera, and H. Nakamura. 1999. H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Lett* 455:188-197.
19. Stanfield, R. L., and I. A. Wilson. 1994. Antigen-induced conformational changes in antibodies: a problem for structural prediction and design. *Trends Biotechnol* 12:275-279.
20. Lemeulle, C., T. Chardes, C. Montavon, H. Chaabihi, J. C. Mani, M. Pugniere, M. Cerutti, G. Devauchelle, B. Pau, and M. Biard-Piechaczyk. 1998. Anti-

- digoxin scFv fragments expressed in bacteria and in insect cells have different antigen binding properties. *FEBS Lett* 423:159-166.
21. Near, R. I., M. Mudgett-Hunter, J. Novotny, R. Bruccoleri, and S. C. Ng. 1993. Characterization of an anti-digoxin antibody binding site by site-directed in vitro mutagenesis. *Mol Immunol* 30:369-377.
 22. Jahn, S., D. Roggenbuck, B. Niemann, and E. S. Ward. 1995. Expression of monovalent fragments derived from a human IgM autoantibody in E. coli. The input of the somatically mutated CDR1/CDR2 and of the CDR3 into antigen binding specificity. *Immunobiology* 193:400-419.
 23. Zhang, M., D. Spey, S. Ackerman, A. Majid, and A. Davidson. 1996. Rheumatoid factor idiotypic and antigenic specificity is strongly influenced by the light chain VJ junction. *J Immunol* 156:3570-3575.
 24. Noel, D., T. Bernardi, I. Navarro-Teulon, M. Marin, J. P. Martinetto, F. Ducancel, J. C. Mani, B. Pau, M. Piechaczyk, and M. Biard-Piechaczyk. 1996. Analysis of the individual contributions of immunoglobulin heavy and light chains to the binding of antigen using cell transfection and plasmon resonance analysis. *J Immunol Methods* 193:177-187.
 25. Li, Y., M. B. Spellerberg, F. K. Stevenson, J. D. Capra, and K. N. Potter. 1996. The I binding specificity of human VH 4-34 (VH 4-21) encoded antibodies is determined by both VH framework region 1 and complementarity determining region 3. *J Mol Biol* 256:577-589.
 26. Harris, L. J., S. B. Larson, K. W. Hasel, and A. McPherson. 1997. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36:1581-1597.
 27. Řezáčová, P. 2004. Structural basis of HIV protease, inhibition by monoclonal antibody. In *Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic*. Charles University, Prague.
 28. Givol, D. 1991. The minimal antigen-binding fragment of antibodies--Fv fragment. *Mol Immunol* 28:1379-1386.
 29. Roux, K. H., A. S. Greenberg, L. Greene, L. Strelets, D. Avila, E. C. McKinney, and M. F. Flajnik. 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11804-11809.
 30. Streltsov, V., and S. Nuttall. 2005. Do sharks have a new antibody lineage? *Immunol Lett* 97:159-160.
 31. Streltsov, V. A., J. N. Varghese, J. A. Carmichael, R. A. Irving, P. J. Hudson, and S. D. Nuttall. 2004. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12444-12449.
 32. Streltsov, V. A., J. A. Carmichael, and S. D. Nuttall. 2005. Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype. *Protein Sci* 14:2901-2909.
 33. Nguyen, V. K., R. Hamers, L. Wyns, and S. Muyldermans. 2000. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *Embo J* 19:921-930.
 34. Conrath, K. E., U. Wernery, S. Muyldermans, and V. K. Nguyen. 2003. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev Comp Immunol* 27:87-103.
 35. Holliger, P., and P. J. Hudson. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23:1126-1136.

36. Leckband, D. 1995. The surface apparatus--a tool for probing molecular protein interactions. *Nature* 376:617-618.
37. Balsera, M., S. Stepaniants, S. Izrailev, Y. Oono, and K. Schulten. 1997. Reconstructing potential energy functions from simulated force-induced unbinding processes. *Biophys J* 73:1281-1287.
38. Izrailev, S., S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono, and K. Schulten. 1997. Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. *Biophys J* 72:1568-1581.
39. Yokota, A., K. Tsumoto, M. Shiroishi, H. Kondo, and I. Kumagai. 2003. The role of hydrogen bonding via interfacial water molecules in antigen-antibody complexation. The HyHEL-10-HEL interaction. *J Biol Chem* 278:5410-5418.
40. Leckband, D. E., T. L. Kuhl, H. K. Wang, W. Muller, J. Herron, and H. Ringsdorf. 2000. Force probe measurements of antibody-antigen interactions. *Methods* 20:329-340.
41. Kohler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
42. Hajduch, M., K. Cwierka, R. Trojanec, and K. Spackova. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii.
43. Lowe, D. 2004. Antibody engineering for future therapeutics. *Biotech-online*:8-13.
44. 2006. Monoclonal Antibody Therapy: Bexxar.
45. Reichert, J. M., C. J. Rosensweig, L. B. Faden, and M. C. Dewitz. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23:1073-1078.
46. Trill, J. J., A. R. Shatzman, and S. Ganguly. 1995. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr Opin Biotechnol* 6:553-560.
47. Hudson, P. J. 1998. Recombinant antibody fragments. *Curr Opin Biotechnol* 9:395-402.
48. Todorovska, A., R. C. Roovers, O. Dolezal, A. A. Kortt, H. R. Hoogenboom, and P. J. Hudson. 2001. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods* 248:47-66.
49. Skerra, A., R. Glockshuber, and A. Pluckthun. 1990. Structural features of the McPC603 Fab fragment not defined in the X-ray structure. *FEBS Lett* 271:203-206.
50. Mallender, W. D., J. Carrero, and E. W. Voss, Jr. 1996. Comparative properties of the single chain antibody and Fv derivatives of mAb 4-4-20. Relationship between interdomain interactions and the high affinity for fluorescein ligand. *J Biol Chem* 271:5338-5346.
51. Polymenis, M., and B. D. Stollar. 1995. Domain interactions and antigen binding of recombinant anti-Z-DNA antibody variable domains. The role of heavy and light chains measured by surface plasmon resonance. *J Immunol* 154:2198-2208.
52. Papanastasiou, D., A. Mamalaki, E. Eliopoulos, K. Poulas, C. Liolitsas, and S. J. Tzartos. 1999. Construction and characterization of a humanized single chain Fv antibody fragment against the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol* 94:182-195.
53. Huston, J. S., D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M. S. Tai, J. Novotny, M. N. Margolies, R. J. Ridge, R. E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea, and et al. 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5879-5883.

54. Bird, R. E., K. D. Hardman, J. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S. M. Lee, T. Lee, S. H. Pope, G. S. Riordan, and M. Whitlow. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423-426.
55. Glockshuber, R., M. Malia, I. Pfitzinger, and A. Pluckthun. 1990. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* 29:1362-1367.
56. Brinkmann, U., P. S. Chowdhury, D. M. Roscoe, and I. Pastan. 1995. Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. *J Immunol Methods* 182:41-50.
57. Arndt, K. M., K. M. Muller, and A. Pluckthun. 2001. Helix-stabilized Fv (hsFv) antibody fragments: substituting the constant domains of a Fab fragment for a heterodimeric coiled-coil domain. *J Mol Biol* 312:221-228.
58. Young, N. M., C. R. MacKenzie, S. A. Narang, R. P. Oomen, and J. E. Baenziger. 1995. Thermal stabilization of a single-chain Fv antibody fragment by introduction of a disulphide bond. *FEBS Lett* 377:135-139.
59. Wheeler, Y. Y., T. E. Kute, M. C. Willingham, S. Y. Chen, and D. C. Sane. 2003. Intrabody-based strategies for inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2: effects on apoptosis, cell growth, and angiogenesis. *Faseb J* 17:1733-1735.
60. Beerli, R. R., W. Wels, and N. E. Hynes. 1994. Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J Biol Chem* 269:23931-23936.
61. Ohage, E. C., P. Wirtz, J. Barnikow, and B. Steipe. 1999. Intrabody construction and expression. II. A synthetic catalytic Fv fragment. *J Mol Biol* 291:1129-1134.
62. der Maur, A. A., C. Zahnd, F. Fischer, S. Spinelli, A. Honegger, C. Cambillau, D. Escher, A. Pluckthun, and A. Barberis. 2002. Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem* 277:45075-45085.
63. Power, B. E., L. Doughty, D. R. Shapira, J. E. Burns, A. M. Bayly, J. M. Caine, Z. Liu, A. M. Scott, P. J. Hudson, and A. A. Kortt. 2003. Noncovalent scFv multimers of tumor-targeting anti-Lewis(y) hu3S193 humanized antibody. *Protein Sci* 12:734-747.
64. Hennecke, F., C. Krebber, and A. Pluckthun. 1998. Non-repetitive single-chain Fv linkers selected by selectively infective phage (SIP) technology. *Protein Eng* 11:405-410.
65. Tang, Y., N. Jiang, C. Parakh, and D. Hilvert. 1996. Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *J Biol Chem* 271:15682-15686.
66. Jager, M., and A. Pluckthun. 1999. Domain interactions in antibody Fv and scFv fragments: effects on unfolding kinetics and equilibria. *FEBS Lett* 462:307-312.
67. Pantoliano, M. W., R. E. Bird, S. Johnson, E. D. Asel, S. W. Dodd, J. F. Wood, and K. D. Hardman. 1991. Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30:10117-10125.
68. Zdanov, A., Y. Li, D. R. Bundle, S. J. Deng, C. R. MacKenzie, S. A. Narang, N. M. Young, and M. Cygler. 1994. Structure of a single-chain antibody variable domain (Fv) fragment complexed with a carbohydrate antigen at 1.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6423-6427.
69. Whitlow, M., D. Filpula, M. L. Rollence, S. L. Feng, and J. F. Wood. 1994. Multivalent Fvs: characterization of single-chain Fv oligomers and preparation of a bispecific Fv. *Protein Eng* 7:1017-1026.

70. Kortt, A. A., R. L. Malby, J. B. Caldwell, L. C. Gruen, N. Ivancic, M. C. Lawrence, G. J. Howlett, R. G. Webster, P. J. Hudson, and P. M. Colman. 1994. Recombinant anti-sialidase single-chain variable fragment antibody. Characterization, formation of dimer and higher-molecular-mass multimers and the solution of the crystal structure of the single-chain variable fragment/sialidase complex. *Eur J Biochem* 221:151-157.
71. Kortt, A. A., M. Lah, G. W. Oddie, C. L. Gruen, J. E. Burns, L. A. Pearce, J. L. Atwell, A. J. McCoy, G. J. Howlett, D. W. Metzger, R. G. Webster, and P. J. Hudson. 1997. Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein Eng* 10:423-433.
72. Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6444-6448.
73. Atwell, J. L., K. A. Breheny, L. J. Lawrence, A. J. McCoy, A. A. Kortt, and P. J. Hudson. 1999. scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng* 12:597-604.
74. Carmichael, J. A., B. E. Power, T. P. Garrett, P. J. Yazaki, J. E. Shively, A. A. Raubischek, A. M. Wu, and P. J. Hudson. 2003. The crystal structure of an anti-CEA scFv diabody assembled from T84.66 scFvs in V(L)-to-V(H) orientation: implications for diabody flexibility. *J Mol Biol* 326:341-351.
75. McGregor, D. P., P. E. Molloy, C. Cunningham, and W. J. Harris. 1994. Spontaneous assembly of bivalent single chain antibody fragments in *Escherichia coli*. *Mol Immunol* 31:219-226.
76. Hayden, M. S., L. K. Gilliland, and J. A. Ledbetter. 1997. Antibody engineering. *Curr Opin Immunol* 9:201-212.
77. Kortt, A. A., O. Dolezal, B. E. Power, and P. J. Hudson. 2001. Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting. *Biomol Eng* 18:95-108.
78. Arndt, K. M., K. M. Muller, and A. Pluckthun. 1998. Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry* 37:12918-12926.
79. Nuttall, S. D., U. V. Krishnan, L. Doughty, K. Pearson, M. T. Ryan, N. J. Hoogenraad, M. Hattarki, J. A. Carmichael, R. A. Irving, and P. J. Hudson. 2003. Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *Eur J Biochem* 270:3543-3554.
80. Johnson, G., and T. T. Wu. 2000. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res* 28:214-218.
81. Riechmann, L., and S. Muyldermans. 1999. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods* 231:25-38.
82. Els Conrath, K., M. Lauwereys, L. Wyns, and S. Muyldermans. 2001. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem* 276:7346-7350.
83. Spinelli, S., L. G. Frenken, P. Hermans, T. Verrips, K. Brown, M. Tegoni, and C. Cambillau. 2000. Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. *Biochemistry* 39:1217-1222.
84. Kretzschmar, T., L. Aoustin, O. Zingel, M. Marangi, B. Vonach, H. Towbin, and M. Geiser. 1996. High-level expression in insect cells and purification of

- secreted monomeric single-chain Fv antibodies. *J Immunol Methods* 195:93-101.
85. Rahbarizadeh, F., M. J. Rasaei, M. Forouzandeh, and A. A. Allameh. 2006. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Immunol* 43:426-435.
 86. Powers, D. B., P. Amersdorfer, M. Poul, U. B. Nielsen, M. R. Shalaby, G. P. Adams, L. M. Weiner, and J. D. Marks. 2001. Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* 251:123-135.
 87. Peeters, K., C. De Wilde, G. De Jaeger, G. Angenon, and A. Depicker. 2001. Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* 19:2756-2761.
 88. Ma, J. K., P. M. Drake, and P. Christou. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4:794-805.
 89. Benvenuto, E., R. J. Ordas, R. Tavazza, G. Ancora, S. Biocca, A. Cattaneo, and P. Galeffi. 1991. 'Phytoantibodies': a general vector for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 17:865-874.
 90. Artsaenko, O., B. Kettig, U. Fiedler, U. Conrad, and K. Doring. 1998. Potatoes tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding* 4:313-319.
 91. Firek, S., J. Draper, M. R. Owen, A. Gandecha, B. Cockburn, and G. C. Whitelam. 1993. Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Mol Biol* 23:861-870.
 92. Petr, J. 2006. Priony cestují na retrovirech. *Vesmír*:652-653.
 93. Bruyns, A. M., G. De Jaeger, M. De Neve, C. De Wilde, M. Van Montagu, and A. Depicker. 1996. Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS Lett* 386:5-10.
 94. Nicholls, P. J., V. G. Johnson, S. M. Andrew, H. R. Hoogenboom, J. C. Raus, and R. J. Youle. 1993. Characterization of single-chain antibody (sFv)-toxin fusion proteins produced in vitro in rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 268:5302-5308.
 95. Jurado, P., D. Ritz, J. Beckwith, V. de Lorenzo, and L. A. Fernandez. 2002. Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 320:1-10.
 96. Skerra, A., and A. Plückthun. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240:1038-1041.
 97. Evans, M. J., S. A. Rollins, D. W. Wolff, R. P. Rother, A. J. Norin, D. M. Therrien, G. A. Grijalva, J. P. Mueller, S. H. Nye, S. P. Squinto, and et al. 1995. In vitro and in vivo inhibition of complement activity by a single-chain Fv fragment recognizing human C5. *Mol Immunol* 32:1183-1195.
 98. Breitling, F., and S. Dubel. 1999. Production and Purification of Recombinant Antibody Fragments. In *Recombinant Antibodies*. John Wiley&sons, Inc. and Spectrum Akademischer Verlag. 109-145.
 99. Ge, L., Knappik, A., Pack, P., Freund, C., and Plückthun, A. 1995. in *Antibody Engineering: Expressing antibodies in Escherichia coli*.229-266.
 100. Duenas, M., J. Vazquez, M. Ayala, E. Soderlind, M. Ohlin, L. Perez, C. A. Borrebaeck, and J. V. Gaviñondo. 1994. Intra- and extracellular expression of an scFv antibody fragment in *E. coli*: effect of bacterial strains and pathway engineering using GroES/L chaperonins. *Biotechniques* 16:476-477, 480-473.

101. Guise, A. D., S. M. West, and J. B. Chaudhuri. 1996. Protein folding in vivo and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Mol Biotechnol* 6:53-64.
102. Huston, J. S., A. J. T. George, M.-S. Tai, J. E. McCartney, D. Jin, D. M. Segal, P. Keck, and H. Oppermann. 1995. Single-chain Fv design and production by preparative folding. In *Antibody Engineering: a practical guide*, 2 ed. C. A. K. Borrebaeck, ed. Oxford University Press, Oxford. 185-209.
103. Power, B. E., and P. J. Hudson. 2000. Synthesis of high avidity antibody fragments (scFv multimers) for cancer imaging. *J Immunol Methods* 242:193-204.
104. Deng, S. J., C. R. MacKenzie, J. Sadowska, J. Michniewicz, N. M. Young, D. R. Bundle, and S. A. Narang. 1994. Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *J Biol Chem* 269:9533-9538.
105. Knappik, A., and A. Pluckthun. 1995. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng* 8:81-89.
106. Worn, A., and A. Pluckthun. 1999. Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. *Biochemistry* 38:8739-8750.
107. Kipriyanov, S. M., G. Moldenhauer, A. C. Martin, O. A. Kupriyanova, and M. Little. 1997. Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Eng* 10:445-453.
108. Jager, M., and A. Pluckthun. 1997. The rate-limiting steps for the folding of an antibody scFv fragment. *FEBS Lett* 418:106-110.
109. Hanes, J., L. Jermutus, S. Weber-Bornhauser, H. R. Bosshard, and A. Pluckthun. 1998. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14130-14135.
110. Coia, G., P. J. Hudson, and R. A. Irving. 2001. Protein affinity maturation in vivo using *E. coli* mutator cells. *J Immunol Methods* 251:187-193.
111. Skerra, A., and A. Pluckthun. 1991. Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein Eng* 4:971-979.
112. Mazor, Y., T. Van Blarcom, R. Mabry, B. L. Iverson, and G. Georgiou. 2007. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 25:563-565.
113. Simmons, L. C., D. Reilly, L. Klimowski, T. S. Raju, G. Meng, P. Sims, K. Hong, R. L. Shields, L. A. Damico, P. Rancatore, and D. G. Yansura. 2002. Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods* 263:133-147.
114. Gao, C., S. Mao, G. Kaufmann, P. Wirsching, R. A. Lerner, and K. D. Janda. 2002. A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12612-12616.
115. Pluckthun, A. *Studying structure and function by directed evolution*.
116. Smith, G. P., and V. A. Petrenko. 1997. Phage Display. *Chem Rev* 97:391-410.
117. McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter, and D. J. Chiswell. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348:552-554.

118. Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, and G. Winter. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352:624-628.
119. Jermutus, L., A. Honegger, F. Schwesinger, J. Hanes, and A. Pluckthun. 2001. Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:75-80.
120. Kieke, M. C., B. K. Cho, E. T. Boder, D. M. Kranz, and K. D. Wittrup. 1997. Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng* 10:1303-1310.
121. Jung, S., A. Honegger, and A. Pluckthun. 1999. Selection for improved protein stability by phage display. *J Mol Biol* 294:163-180.
122. Forrer, P., S. Jung, and A. Pluckthun. 1999. Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Curr Opin Struct Biol* 9:514-520.
123. Krebber, C., S. Spada, D. Desplancq, A. Krebber, L. Ge, and A. Pluckthun. 1997. Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein-ligand interactions. *J Mol Biol* 268:607-618.
124. Genetics, M. P. I. f. M. 2006. Filamentous Phage Display. Berlin.
125. Mattheakis, L. C., R. R. Bhatt, and W. J. Dower. 1994. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9022-9026.
126. Schaffitzel, C., J. Hanes, L. Jermutus, and A. Pluckthun. 1999. Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J Immunol Methods* 231:119-135.
127. Hanes, J., L. Jermutus, and A. Pluckthun. 2000. Selecting and evolving functional proteins in vitro by ribosome display. *Methods Enzymol* 328:404-430.
128. Hudson, P. J., and C. Souriau. 2003. Engineered antibodies. *Nat Med* 9:129-134.
129. Dall'Acqua, W., and P. Carter. 1998. Antibody engineering. *Curr Opin Struct Biol* 8:443-450.
130. Mossner, E., and A. Pluckthun. 2001. Directed Evolution with Fast and Efficient Selection Technologies. *Chimia* 55:324-328.
131. Irving, R. A., G. Coia, A. Roberts, S. D. Nuttall, and P. J. Hudson. 2001. Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J Immunol Methods* 248:31-45.
132. Coia, G., L. Pontes-Braz, S. D. Nuttall, P. J. Hudson, and R. A. Irving. 2001. Panning and selection of proteins using ribosome display. *J Immunol Methods* 254:191-197.
133. Amstutz, P., P. Forrer, C. Zahnd, and A. Pluckthun. 2001. In vitro display technologies: novel developments and applications. *Curr Opin Biotechnol* 12:400-405.
134. Hanes, J., C. Schaffitzel, A. Knappik, and A. Pluckthun. 2000. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol* 18:1287-1292.
135. Schimmele, B., and A. Pluckthun. 2005. Identification of a functional epitope of the Nogo receptor by a combinatorial approach using ribosome display. *J Mol Biol* 352:229-241.
136. Jirholt, P., L. Strandberg, B. Jansson, E. Krambovitis, E. Soderlind, C. A. Borrebaeck, R. Carlsson, L. Danielsson, and M. Ohlin. 2001. A central core structure in an antibody variable domain determines antigen specificity. *Protein Eng* 14:67-74.

137. Lantto, J., and M. Ohlin. 2002. Functional consequences of insertions and deletions in the complementarity-determining regions of human antibodies. *J Biol Chem* 277:45108-45114.
138. Hugo, N., M. Weidenhaupt, M. Beukes, B. Xu, J. C. Janson, T. Vernet, and D. Altschuh. 2003. VL position 34 is a key determinant for the engineering of stable antibodies with fast dissociation rates. *Protein Eng* 16:381-386.
139. Owens, R. J., and R. J. Young. 1994. The genetic engineering of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 168:149-165.
140. Knappik, A., L. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G. Wellnhofer, A. Hoess, J. Wolle, A. Pluckthun, and B. Virnekas. 2000. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296:57-86.
141. de Haard, H. J., B. Kazemier, A. van der Bent, P. Oudshoorn, P. Boender, B. van Gemen, J. W. Arends, and H. R. Hoogenboom. 1998. Absolute conservation of residue 6 of immunoglobulin heavy chain variable regions of class IIA is required for correct folding. *Protein Eng* 11:1267-1276.
142. Jung, S., S. Spinelli, B. Schimmele, A. Honegger, L. Pugliese, C. Cambillau, and A. Pluckthun. 2001. The importance of framework residues H6, H7 and H10 in antibody heavy chains: experimental evidence for a new structural subclassification of antibody V(H) domains. *J Mol Biol* 309:701-716.
143. Carter, P., L. Presta, C. M. Gorman, J. B. Ridgway, D. Henner, W. L. Wong, A. M. Rowland, C. Kotts, M. E. Carver, and H. M. Shepard. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.
144. Jirholt, P., M. Ohlin, C. A. Borrebaeck, and E. Soderlind. 1998. Exploiting sequence space: shuffling in vivo formed complementarity determining regions into a master framework. *Gene* 215:471-476.
145. Tomlinson, I. M., G. Walter, P. T. Jones, P. H. Dear, E. L. Sonnhhammer, and G. Winter. 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J Mol Biol* 256:813-817.
146. Soderlind, E., L. Strandberg, P. Jirholt, N. Kobayashi, V. Alexeiva, A. M. Aberg, A. Nilsson, B. Jansson, M. Ohlin, C. Wingren, L. Danielsson, R. Carlsson, and C. A. Borrebaeck. 2000. Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat Biotechnol* 18:852-856.
147. Holmes, M. A., T. N. Buss, and J. Foote. 2001. Structural effects of framework mutations on a humanized anti-lysozyme antibody. *J Immunol* 167:296-301.
148. Yazaki, P. J., M. A. Sherman, J. E. Shively, D. Ikle, L. E. Williams, J. Y. Wong, D. Colcher, A. M. Wu, and A. A. Raubitschek. 2004. Humanization of the anti-CEA T84.66 antibody based on crystal structure data. *Protein Eng Des Sel* 17:481-489.
149. Ewert, S., A. Honegger, and A. Pluckthun. 2004. Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods* 34:184-199.
150. Son, J. H., U. H. Lee, J. J. Lee, B. Kwon, B. S. Kwon, and J. W. Park. 2004. Humanization of agonistic anti-human 4-1BB monoclonal antibody using a phage-displayed combinatorial library. *J Immunol Methods* 286:187-201.
151. Ewert, S., T. Huber, A. Honegger, and A. Pluckthun. 2003. Biophysical properties of human antibody variable domains. *J Mol Biol* 325:531-553.

152. Dall'Acqua, W. F., M. M. Damschroder, J. Zhang, R. M. Woods, L. Widjaja, J. Yu, and H. Wu. 2005. Antibody humanization by framework shuffling. *Methods* 36:43-60.
153. Kashmiri, S. V., R. De Pascalis, N. R. Gonzales, and J. Schlom. 2005. SDR grafting--a new approach to antibody humanization. *Methods* 36:25-34.
154. Baker, M. 2005. Upping the ante on antibodies. *Nat Biotechnol* 23:1065-1072.
155. Chen, J., S. Jaracz, X. Zhao, S. Chen, and I. Ojima. 2005. Antibody-cytotoxic agent conjugates for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2:873-890.
156. Rihova, B., J. Strohalm, K. Kubackova, M. Jelinkova, O. Hovorka, M. Kovar, D. Plocova, M. Sirova, M. St'astny, L. Rozprimova, and K. Ulbrich. 2002. Acquired and specific immunological mechanisms co-responsible for efficacy of polymer-bound drugs. *J Control Release* 78:97-114.
157. Adams, G. P., and L. M. Weiner. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147-1157.
158. Wu, A. M., and P. D. Senter. 2005. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23:1137-1146.
159. Levi, M., M. Sallberg, U. Ruden, D. Herlyn, H. Maruyama, H. Wigzell, J. Marks, and B. Wahren. 1993. A complementarity-determining region synthetic peptide acts as a miniantibody and neutralizes human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4374-4378.
160. Colcher, D., R. Bird, M. Roselli, K. D. Hardman, S. Johnson, S. Pope, S. W. Dodd, M. W. Pantoliano, D. E. Milenic, and J. Schlom. 1990. In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J Natl Cancer Inst* 82:1191-1197.
161. Kabat, E. A., and T. T. Wu. 1991. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol* 147:1709-1719.
162. Bes, C., L. Briant-Longuet, M. Cerruti, P. De Berardinis, G. Devauchelle, C. Devaux, C. Granier, and T. Chardes. 2001. Efficient CD4 binding and immunosuppressive properties of the 13B8.2 monoclonal antibody are displayed by its CDR-H1-derived peptide CB1. *FEBS Lett* 508:67-74.
163. Saragovi, H. U., D. Fitzpatrick, A. Raktabutr, H. Nakanishi, M. Kahn, and M. I. Greene. 1991. Design and synthesis of a mimetic from an antibody complementarity-determining region. *Science* 253:792-795.
164. Dougall, W. C., N. C. Peterson, and M. I. Greene. 1994. Antibody-structure-based design of pharmacological agents. *Trends Biotechnol* 12:372-379.
165. Sannes, L. 2007. Monoclonal Antibodies: From Magic Bullets to Successful Drugs. *Pharma DD*.
166. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, eds. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
167. Studier, F. W., and B. A. Moffat. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes *J Mol Biol* 189:113-130.
168. Schneider, I. 1972. Cell Lines Derived from Late Embryonic Stage of *Drosophila melanogaster* *J Embryol Exp Morph* 27:363-365.
169. Andreánsky, M. 1990. Expresia a procesing prekurzorov retrovirálních proteináz v *Escherichia coli*. In *Ústav molekulární genetiky, Akademie věd České republiky*, Praha.

170. Orlandi, R., D. H. Gussow, P. T. Jones, and G. Winter. 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3833-3837.
171. Kabat, A. E., T. T. Wu, M. Reid-Miller, H. M. Perry, and K. S. Gottesmann. 1987. *Sequences of proteins of immunological interest*.
172. Rezacova, P., J. Brynda, M. Fabry, M. Horejsi, R. Stouracova, J. Lescar, V. Chitarra, M. M. Riottot, J. Sedlacek, and G. A. Bentley. 2002. Inhibition of HIV protease by monoclonal antibodies. *J Mol Recognit* 15:272-276.
173. Evan, G. I., G. K. Lewis, G. Ramsay, and J. M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5:3610-3616.
174. Kapralek, F., P. Jecmen, J. Sedlacek, M. Fabry, and S. Zadrazil. 1991. Fermentations conditions for high level expression of the tac-promoter-controlled calf prochymosin cDNA in *Escheria coli* HB101. *Biotech Bioeng* 37.
175. Marston F.A.O., Lowe P.A., Doel M.T., Schoemaker J.M., White S., and A. S. 1984. Purification of calf prochymosin (prorennin) syntetized by *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 2:800-804.
176. Kurucz, I., J. A. Titus, C. R. Jost, and D. M. Segal. 1995. Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies. *Mol Immunol* 32:1443-1452.
177. Tsumoto, K., K. Shinoki, H. Kondo, M. Uchikawa, T. Juji, and I. Kumagai. 1998. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent--application to a human single-chain Fv fragment. *J Immunol Methods* 219:119-129.
178. Asano, R., T. Kudo, Y. Nishimura, K. Makabe, H. Hayashi, M. Suzuki, K. Tsumoto, and I. Kumagai. 2002. Efficient construction of a diabody using a refolding system: anti-carcinoembryonic antigen recombinant antibody fragment. *J Biochem (Tokyo)* 132:903-909.
179. Buchner, J., I. Pastan, and U. Brinkmann. 1992. A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal Biochem* 205:263-270.
180. Brinkmann, U., J. Buchner, and I. Pastan. 1992. Independent domain folding of *Pseudomonas* exotoxin and single-chain immunotoxins: influence of interdomain connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3075-3079.
181. Suh, J. K., L. L. Poulsen, D. M. Ziegler, and J. D. Robertus. 1999. Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2687-2691.
182. Griep, R. A., C. van Twisk, R. J. Kerschbaumer, K. Harper, L. Torrance, G. Himmler, J. M. van der Wolf, and A. Schots. 1999. pSKAP/S: An expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins. *Protein Expr Purif* 16:63-69.
183. Kipriyanov, S. M., G. Moldenhauer, and M. Little. 1997. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *J Immunol Methods* 200:69-77.
184. Bayly, A. M., A. A. Kortt, P. J. Hudson, and B. E. Power. 2002. Large-scale bacterial fermentation and isolation of scFv multimers using a heat-inducible bacterial expression vector. *J Immunol Methods* 262:217-227.

185. Štouračová, R. 2000. Struktura a interakce monoklonálních protilátek inhibujících retrovirovou proteázu HIV. In *Ústav molekulární genetiky, Akademie věd České republiky, Praha*.
186. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
187. Gorg, A., W. Postel, and R. Westermeier. 1978. Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane. *Anal Biochem* 89:60-70.
188. Oakley, B. R., D. R. Kirsch, and N. R. Morris. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105:361-363.
189. Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
190. Zavada, J., Z. Zavadova, J. Pastorek, Z. Biesova, J. Jezek, and J. Velek. 2000. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br J Cancer* 82:1808-1813.
191. Peknicova, J., A. Kubatova, V. Sulimenko, E. Draberova, V. Viklicky, P. Hozak, and P. Draber. 2001. Differential subcellular distribution of tubulin epitopes in boar spermatozoa: recognition of class III beta-tubulin epitope in sperm tail. *Biol Reprod* 65:672-679.
192. Gros, C., and B. Labouesse. 1969. Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins. *Eur J Biochem* 7:463-470.
193. Plummer, T. H., Jr., and A. L. Tarentino. 1981. Facile cleavage of complex oligosaccharides from glycopeptides by almond emulsin peptide: N-glycosidase. *J Biol Chem* 256:10243-10246.
194. Oelschlaeger, P., S. Lange, J. Schmitt, M. Siemann, M. Reuss, and R. D. Schmid. 2003. Identification of factors impeding the production of a single-chain antibody fragment in *Escherichia coli* comparing in vivo and in vitro expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:123-132.
195. Kirkpatrick, R. B., S. Ganguly, M. Angelichio, S. Griego, A. Shatzman, C. Silverman, and M. Rosenberg. 1995. Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated pathway. *J Biol Chem* 270:19800-19805.
196. Rubin, D. M., A. D. Mehta, J. Zhu, S. Shoham, X. Chen, Q. R. Wells, and K. B. Palter. 1993. Genomic structure and sequence analysis of *Drosophila melanogaster* HSC70 genes. *Gene* 128:155-163.
197. Stark, G. R., W. H. Stein, and S. Moore. 1960. Reactions of the Cyanate Present in Aqueous Urea with Amino Acids and Proteins. *J Biol Chem* 235:3177-3181.
198. Draberova, E., Z. Lukas, D. Ivanyi, V. Viklicky, and P. Draber. 1998. Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochem Cell Biol* 109:231-239.
199. Jordan, E., M. Hust, A. Roth, R. Biedendieck, T. Schirrmann, D. Jahn, and S. Dubel. 2007. Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact* 6:2.
200. Krebber, A., S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H. R. Bosshard, and A. Pluckthun. 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* 201:35-55.

201. Shan, D., O. W. Press, T. T. Tsu, M. S. Hayden, and J. A. Ledbetter. 1999. Characterization of scFv-Ig constructs generated from the anti-CD20 mAb 1F5 using linker peptides of varying lengths. *J Immunol* 162:6589-6595.
202. Sullivan, K. F., and D. W. Cleveland. 1986. Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4327-4331.
203. Alexander, J. E., D. F. Hunt, M. K. Lee, J. Shabanowitz, H. Michel, S. C. Berlin, T. L. MacDonald, R. J. Sundberg, L. I. Rebhun, and A. Frankfurter. 1991. Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4685-4689.
204. Svecova, H., V. Kleinova, D. Seifert, H. Chaloupkova, J. Baurle, K. Kranda, V. Kral, and M. Fiser. 2008. Radioiodination of mouse anti-III beta-tubulin antibodies and their evaluation with respect to their use as diagnostic agents for peripheral neuropathies. *Appl Radiat Isot* 66:310-316.
205. Chrastina, A., J. Zavada, S. Parkkila, S. Kaluz, M. Kaluzova, J. Rajcani, J. Pastorek, and S. Pastorekova. 2003. Biodistribution and pharmacokinetics of ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody M75 specific for carbonic anhydrase IX, an intrinsic marker of hypoxia, in nude mice xenografted with human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 105:873-881.
206. Pastorekova, S., Z. Zavadova, M. Kostal, O. Babusikova, and J. Zavada. 1992. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology* 187:620-626.
207. Zavadova, Z., and J. Zavada. 2005. Carbonic anhydrase IX (CA IX) mediates tumor cell interactions with microenvironment. *Oncol Rep* 13:977-982.
208. Ivanov, S., S. Y. Liao, A. Ivanova, A. Danilkovitch-Miagkova, N. Tarasova, G. Weirich, M. J. Merrill, M. A. Proescholdt, E. H. Oldfield, J. Lee, J. Zavada, A. Waheed, W. Sly, M. I. Lerman, and E. J. Stanbridge. 2001. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 158:905-919.
209. Kral, V., P. Mader, R. Collard, M. Fabry, M. Horejsi, P. Rezacova, M. Kozisek, J. Zavada, J. Sedlacek, L. Rulisek, and J. Brynda. 2007. Stabilization of antibody structure upon association to a human carbonic anhydrase IX epitope studied by X-ray crystallography, microcalorimetry, and molecular dynamics simulations. *Proteins*.
210. Lescar, J., J. Brynda, P. Rezacova, R. Stouracova, M. M. Riottot, V. Chitarra, M. Fabry, M. Horejsi, J. Sedlacek, and G. A. Bentley. 1999. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by a monoclonal antibody. *Protein Sci* 8:2686-2696.
211. Lescar, J., J. Brynda, M. Fabry, M. Horejsi, P. Rezacova, J. Sedlacek, and G. A. Bentley. 2003. Structure of a single-chain Fv fragment of an antibody that inhibits the HIV-1 and HIV-2 proteases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:955-957.
212. Pastorekova, S., and J. Zavada. 2004. Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy. *Cancer Therapy* 2:245-262.
213. Malecki, M., A. Hsu, L. Truong, and S. Sanchez. 2002. Molecular immunolabeling with recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibodies designed with metal-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:213-218.
214. Rumbley, C. A., L. K. Denzin, L. Yantz, S. Y. Tetin, and E. W. Voss, Jr. 1993. Construction, characterization, and selected site-specific mutagenesis of an anti-single-stranded DNA single-chain autoantibody. *J Biol Chem* 268:13667-13674.

215. Padiolleau-Lefevre, S., C. Alexandrenne, F. Dkhissi, G. Clement, S. Essono, C. Blache, J. Y. Couraud, A. Wijkhuisen, and D. Boquet. 2007. Expression and detection strategies for an scFv fragment retaining the same high affinity than Fab and whole antibody: Implications for therapeutic use in prion diseases. *Mol Immunol* 44:1888-1896.
216. Iliades, P., D. A. Dougan, G. W. Oddie, D. W. Metzger, P. J. Hudson, and A. A. Kortt. 1998. Single-chain Fv of anti-idiotypic 11-1G10 antibody interacts with antibody NC41 single-chain Fv with a higher affinity than the affinity for the interaction of the parent Fab fragments. *J Protein Chem* 17:245-254.
217. Piszczek, G., S. D'Auria, M. Staiano, M. Rossi, and A. Ginsburg. 2004. Conformational stability and domain coupling in D-glucose/D-galactose-binding protein from *Escherichia coli*. *Biochem J* 381:97-103.
218. Todd, M. J., and E. Freire. 1999. The effect of inhibitor binding on the structural stability and cooperativity of the HIV-1 protease. *Proteins* 36:147-156.
219. Zavada, J., Z. Zavadova, M. Zat'ovicova, L. Hyrs, and I. Kawaciuk. 2003. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer* 89:1067-1071.
220. Richardson, J. H., and W. A. Marasco. 1995. Intracellular antibodies: development and therapeutic potential. *Trends Biotechnol* 13:306-310.
221. Lescar, J., R. Stouracova, M. M. Riottot, V. Chitarra, J. Brynda, M. Fabry, M. Horejsi, J. Sedlacek, and G. A. Bentley. 1996. Preliminary crystallographic studies of an anti-HIV-1 protease antibody that inhibits enzyme activity. *Protein Sci* 5:966-968.
222. Katz, R. A., and A. M. Skalka. 1994. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:133-173.
223. Davies, D. R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 19:189-215.
224. Strisovsky, K., U. Tessmer, J. Langner, J. Konvalinka, and H. G. Krausslich. 2000. Systematic mutational analysis of the active-site threonine of HIV-1 proteinase: rethinking the "fireman's grip" hypothesis. *Protein Sci* 9:1631-1641.
225. Wlodawer, A., M. Miller, M. Jaskolski, B. K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I. T. Weber, L. M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, and S. B. Kent. 1989. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245:616-621.
226. Rezacova, P., J. Lescar, J. Brynda, M. Fabry, M. Horejsi, J. Sedlacek, and G. A. Bentley. 2001. Structural basis of HIV-1 and HIV-2 protease inhibition by a monoclonal antibody. *Structure* 9:887-895.
227. Bartoňová, V., V. Král, I. Sieglova, J. Brynda, M. Fábry, M. Hořejší, M. Kožíšek, G. K. Šašková, J. Konvalinka, J. Sedláček, and P. Řezáčová. *Accepted*. Potent inhibition of drug-resistant HIV protease variants by monoclonal antibodies. *Antiviral Therapy*.
228. Szollosi, J., V. Horejsi, L. Bene, P. Angelisova, and S. Damjanovich. 1996. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol* 157:2939-2946.
229. Chu, P. G., S. Loera, Q. Huang, and L. M. Weiss. 2006. Lineage determination of CD20- B-Cell neoplasms: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 126:534-544.

230. Buske, C., O. Weigert, M. Dreyling, M. Unterhalt, and W. Hiddemann. 2006. Current status and perspective of antibody therapy in follicular lymphoma. *Haematologica* 91:104-112.
231. Bhatia, A., P. J. Ell, and J. C. Edwards. 2005. Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) as an adjunct in the treatment of giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 64:1099-1100.
232. Eisenberg, R. 2003. SLE - Rituximab in lupus. *Arthritis Res Ther* 5:157-159.
233. Semac, I., C. Palomba, K. Kulangara, N. Klages, G. van Echten-Deckert, B. Borisch, and D. C. Hoessli. 2003. Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer Res* 63:534-540.
234. El Fassi, D., C. H. Nielsen, H. C. Hasselbalch, and L. Hegedus. 2006. The rationale for B lymphocyte depletion in Graves' disease. Monoclonal anti-CD20 antibody therapy as a novel treatment option. *Eur J Endocrinol* 154:623-632.
235. Cilley, J., and J. N. Winter. 2006. Radioimmunotherapy and autologous stem cell transplantation for the treatment of B-cell lymphomas. *Haematologica* 91:114-120.
236. Emmanouilides, C. 2006. [Radioimmunotherapy for non-Hodgkin lymphoma: historical development and current status]. *Rev Esp Med Nucl* 25:42-54.
237. Sany, J. 2006. [Monoclonal antibodies in the treatment of rheumatoid arthritis: toward a therapeutic revolution]. *C R Biol* 329:228-240.
238. Smith, K. G., R. B. Jones, S. M. Burns, and D. R. Jayne. 2006. Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: Remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis Rheum* 54:2970-2982.
239. Ahmadi-Simab, K., P. Lamprecht, B. Nolle, M. Ai, and W. L. Gross. 2005. Successful treatment of refractory anterior scleritis in primary Sjogren's syndrome with rituximab. *Ann Rheum Dis* 64:1087-1088.
240. Kamar, N., L. Rostaing, and L. Alric. 2006. Treatment of hepatitis C-virus-related glomerulonephritis. *Kidney Int* 69:436-439.
241. Du, J., H. Wang, C. Zhong, B. Peng, M. Zhang, B. Li, S. Huo, Y. Guo, and J. Ding. 2007. Structural Basis for Recognition of CD20 by Therapeutic Antibody Rituximab. *J Biol Chem* 282:15073-15080.