

37. OTDK Biológia Szekció

Nivolumab (PD-1-gátló) klónozása és expressziója emlős sejtvonalban

Hallgató: Koka Alice, Génsebészet szak, IV évfolyam
Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar

Témavezetők: dr. Csató-Kovács Erika, adjunktus
dr. Albert Beáta, egyetemi tanár

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETŐ	4
1.1. Monoklonális antitestek	4
1.1.1. Antitestek struktúrája és funkciója	4
1.2. Monoklonális ellenanyagok előállítása	6
1.3. A monoklonális ellenanyagok terápiás szerepük	7
1.3.1. Tumor terápia	8
1.3.1.1. Immunellenőrző pontok	9
1.4. Nivolumab (PD-1-gátló)	10
1.4.2. Nivolumab és PD-1-gátló komplex	11
1.5. Monoklonális antitestek előállítására alkalmas expressziós rendszerek	12
2. CÉLKITŰZÉSEK	14
2.1. Másodlagos célkitűzések	15
2.1.1. Expressziós vektorok megépítése	15
2.1.2. Expresszió ellenőrzése	16
3. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN	16
3.1. Alkalmazott plazmidok felszorzozása és ellenőrzése	16
3.1.1. A plazmidok és sejtvonal tulajdonságai	16
3.1.2. Kémiai kompetens sejtek készítése	18
3.1.3. Kémiai transzformálás	18
3.1.4. Plazmid izolálás	19
3.1.5. Plazmidok ellenőrzése emésztéssel	19
3.1.6. Agaróz gélelektroforézis	20
3.2. A pcDNA3.3-O vektor létrehozása	20
3.2.1. Az oligonukleotidok hibridizálása	20
3.2.2. A vektor emésztése	21
3.2.3. A vektor gélből izolálása	21
3.2.4. DNS koncentrációk meghatározása	21
3.2.5. Ligálás	22
3.2.6. Transzformálás	22
3.2.7. A pcDNA3.3-O rekombináns konstrukció ellenőrzése	22
3.3. Rekombináns konstrukciók létrehozása (pcDNA3.3-O-NivoHC és pOptiVEC-NivoHC)	23

3.3.1. Az inszert és a vektor DNS előkészítése	23
3.3.2. DNS koncentrációk meghatározása és ligálás	23
3.3.3. Rekombináns konstrukciók ellenőrzése	24
3.3.3.1. Kolónia PCR	24
3.3.3.2. Ellenőrzés restrikciós emésztéssel	25
3.5. A Nivolumab expressziójának ellenőrzése SDS-PAGE-el	26
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	28
4.1. Az alkalmazott plazmidok felsokszorozása és ellenőrzése	28
4.2. A pcDNA3.3-O vektor létrehozása	30
4.3. Rekombináns konstrukciók létrehozása	32
4.4. Nivolumab expressziója és ellenőrzése SDS-PAGE-el	35
5. KÖVETKEZTETÉSEK	37
BIBLIOGRÁFIA	38

1. Bevezető

1.1. Monoklonális antitestek

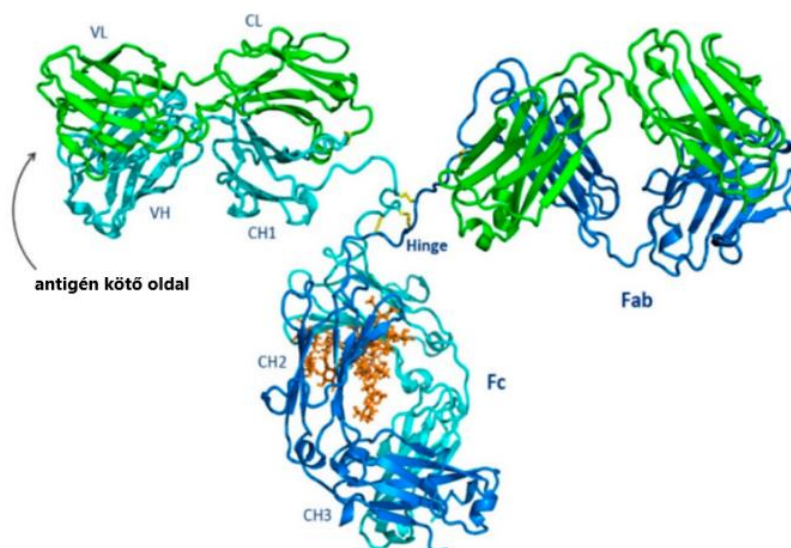
Az antitesteket először 1890-ben írta le Behring és Shibasaburo a diftéria állatmodeljeivel kapcsolatos munkájukban, akkoriban úgy vélték, hogy az antitestek vérben található semlegesítő anyagok. Viszont a következő évszázad alatt, rengeteg fontos előrelépés történt az antitestek rákterápiás szerként történő felhasználására. Heidelberg és Avery azonosította az antitesteket olyan fehérjékként, amelyek képesek felismerni specifikus antigéneket és 1974-ben Astrid Fagraeus bebizonyította, hogy az antitesteket az adaptív immunrendszer B-sejtjei termelik. A későbbiekben Sir Gustav Nossal által felvetődött a klonális szelekciós elmélet, amelyet sikeresen bizonyított is, és amely alapján egyetlen B-sejt klón egy specifikus antitestet termel. Ez alapján, megfogalmazhatjuk, hogy a monoklonális antitestek egyedi B-sejt klónjai által termelt antitestek, ráadásul mindegyik egy epitópként ismert antigén specifikus részeihez kötődik (Zahavi és Weiner 2020). Manapság már elmondható, hogy monoklonális antitesteket írnak fel terápiás célra rák, vagy autoimmun rendellenességek kezelésére is. Az elmúlt két évtized során a monoklonális antitestek a humán terápiák leggyorsabban növekvő osztályává váltak (Böttinger és mtsai. 2022). Annak érdekében, hogy jobban megértsük, a monoklonális antitestek működését a rákterápiákban, szükséges ismernünk a szerkezetüket, hatásmechanizmusukat és klinikai felhasználásukat.

1.1.1. Antitestek struktúrája és funkciója

A gerincesek adaptív immunrendszere a potenciális korokozók széles skálájával szemben képes válaszreakciót kiépíteni. Ebből adódóan, kritikus fontosságúak az antitestek, amelyek nagy affinitással és specificitással rendelkező molekuláris minták sokféle készletének felismerésére specializálódtak. Ez a természetes szerep az idegen részecskék elleni védekezésben az antitesteket egyre népszerűbb választássá teszi a terápiás fejlesztés során (Ruffolo, Sulam, és Gray 2022).

Az antitestek nagyméretű glikoproteinek, amelyek az immunglobulinok (Ig) szupercsaládjába tartoznak és szerepük az immunrendszerben az idegen antigének felismerése, semlegesítése és további immunválasz kiváltása. Alapszerkezetük két nehéz és két könnyű láncból áll, amelyek Y alakúak. Az Y mindegyik csúcsán található egy antigénkötő rész, amelynek feladata a specifikus antigén felismerése. Az Y-struktúra alján található fragmens kristályosítható régió, amely kölcsönhatásokat közvetít az antitest és az immunrendszer más

tagjai között (Zahavi és Weiner 2020). Az 1-es ábrán látható az antitestmolekula három funkcionális komponense, a két antigénkötő domén (Fab) és a kristályosítható (Fc) domén, ahol a két Fab egy csuklórégióval kapcsolódik az Fc-hez, amely lehetővé teszi az Fab domének nagyfokú konformációját. Emellett az ábrán zöld színnel vannak elkülönítve a könnyű láncok, ciánkék színnel pedig a nehéz láncok. A glikán narancssárga-, míg a diszulfidhidak sárga színnel vannak jelölve (Chiu és mtsai. 2019).



1. ábra Immunoglobulin struktúrája, zöld színnel a könnyű láncok-, ciánkék színnel a nehéz láncok láthatóak. Glikán narancssárga-, a diszulfidhidak sárga színűek (Chiu és mtsai. 2019).

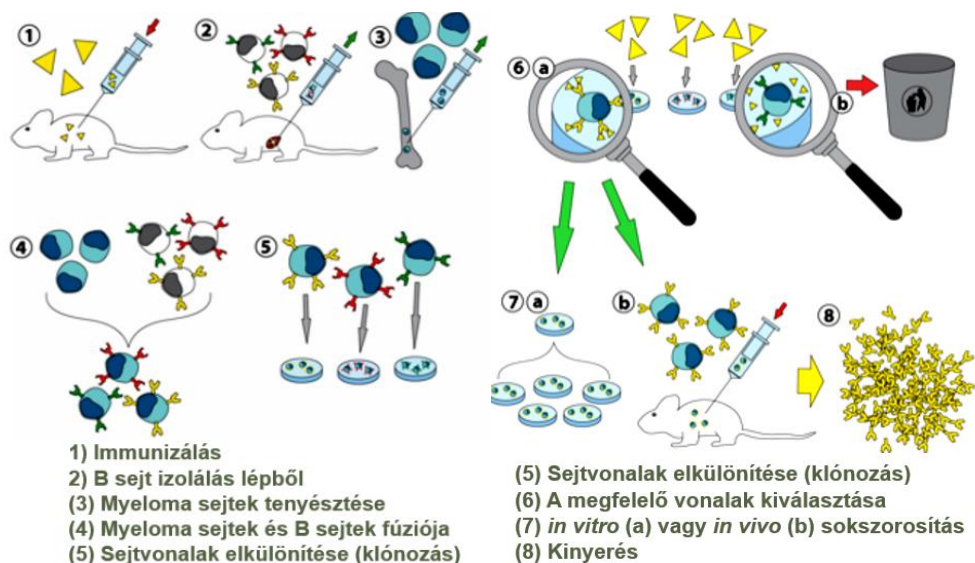
Az antitest kristályosítható régióit az immunsejtek többségében megtalálható Fc receptorok ismerik fel. A nehéz lánc típusa alapján az antitestek öt különböző osztályba sorolhatók: IgA, IgD, IgE, IgG és IgM. Az IgG az antitestterápiában leggyakrabban használt forma, mivel az IgG-k kölcsönhatásba lépnek a hozzájuk kapcsolódó FcR-típussal, az Fc γ R-rel, amely a természetes ölüsejteken, valamint a neutrofileken, monocitákon, dendritikus sejteken és eozinofileken található. A feladata, hogy speciális funkciókat közvetít, példának okáért, az antitest-függő sejtes citotoxicitást és komplementfüggő citotoxicitást. Az IgG osztályt további alakokra lehet osztani az Fc régió azon képessége alapján, hogy elősegíti-e ezeket a funkciókat: IgG1 és IgG3 antitest-függő citotoxicitást és komplementfüggő citotoxicitást váltanak ki, míg az IgG2 és IgG4 nem váltanak ki hasonló funkciókat (Zahavi és Weiner 2020). A továbbiakban a monoklonális antitestek előállítását szeretnénk tárgyalni, azon belül a klinikai felhasználásukat, illetve a tumor terápiában betöltött szerepüket, alkalmazásukat és fontosságukat. Ezt követően, a kutatásunkban fő szerepet játszó Nivolumab monoklonális

antitest bemutatását olvashatjuk, illetve az irodalmi áttekintő végén a monoklonális ellenanyagok emlős sejtekbe történő expresszióját mutatjuk be.

1.2. Monoklonális ellenanyagok előállítása

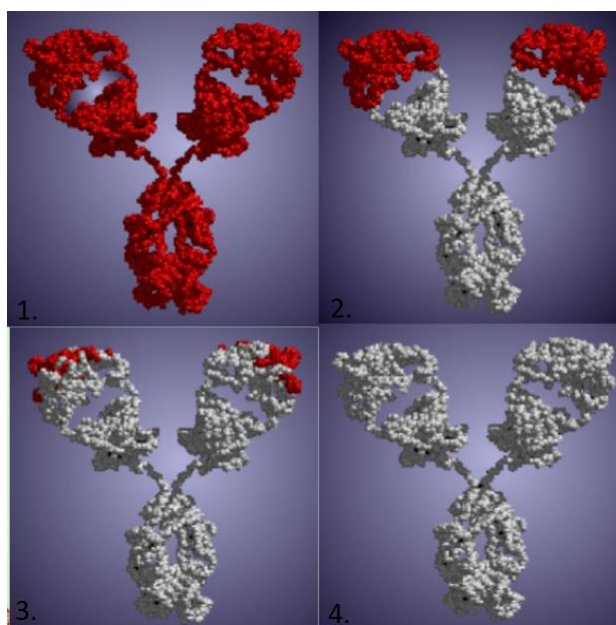
A monoklonális ellenanyagok előállítására szolgáló módszereket először Schwaber azonosította 1973-ban, viszont ennek ellenére elsőként Köhler és Milstein alkalmazta az emberből származó hibridómák létrehozására, amelyek azóta is a terápiás antitestek előállításának az alapját képezik. Nemsokkal a hibridómák felfedezése után elkezdődött a monoklonális ellenanyagok rák kezelésére való alkalmazásának széles körű kutatása (Böttinger és mtsai. 2022). Ebből adódóan, az antitestek előállítására több technikát is kidolgoztak, mint például az egerben–hibridóma sejtek létrehozásával; a genetikailag módosított egerben–kiméra antitestek termelése; vagy a „fág display” technika–módosított humán antitestek létrehozására (Katona és mtsai. 2017).

A hibridóma olyan immortalizált rákos szövetből származó sejt, amely korlátlanul képes szaporodni, emellett mielóma sejt, amely korlátlan osztódást biztosít és immunizált egér lépsejt fúziójával keletkezik. Első lépésként, az egeret immunizálják a megfelelő antigénnel, majd az izolált lépsejteket a mielóma sejtekkel fuzionáltatják. A létrehozott hibridóma sejteket felszaporítják és az általuk termelt antitesteket a tápfolyadékból kinyerik (Mattiuzzi és Lippi 2019). Ezt a módszert elsősorban diagnosztikai célokra alkalmazzák, terápiás antitestek termelésére ritkán, mivel többszöri használat során allergiás reakciók jelenhetnek meg, az egér ellenes humán antitestek képződése által. A hibridóma módszer lépéseit a 2-es ábra mutatja.



2. ábra A hibridóma technika lépései (Katona és mtsai., 2017.)

Katona és mtsai. (2017) tanulmányukban leírják, hogy a genetikailag módosított módszer esetében, egy olyan rekombináns fehérjét állítanak elő, amely egér és humán szekvenciákat egyaránt tartalmaz. A kiméra antitestek 75%-a, a humanizált antitestek pedig 90%-a humán. Az egér antitest pár részét humánra cserélik, hogy az egér ellenes humán antitesteknek a termelődését megakadályozzák. Ezeket az antitesteket emlős sejt kultúrákban termeltetik, viszont *in vitro* módon is megvalósítható. A terápiában használt antitestek típusait a 3-as ábra szemlélteti, ahol az 1-es az egér-, a 2-es a humán-, a 3-as a kiméra, illetve a 4-es a humanizált antitest.



3. ábra A terápiában alkalmazott antitestek típusai (Katona és mtsai. 2017)

1.3. A monoklonális ellenanyagok terápiás szerepük

Több kísérlet is igazolta, hogy a melanóma elleni monoklonális antitestek elnyomják a humán melanómák növekedését egerekben. Ez alapján, 1980-ban végezték el az első humán kísérletet a rák elleni monoklonális antitestek-terápiával, egy limfómás betegen. Sajnos a korai terápiás antitestek egér-eredete miatt immunogének voltak emberekben és kevésbé indukálták az immunitást a betegben. Ebből adódóan, 1980-as évek végén különböző technikák jelentek meg az antitestek humanizálására. A további előrelépések „teljesen humán” antitestek előállításához vezettek transzgenikus egerek vagy *in vitro* élesztő- esetleg fág rendszerek felhasználásával (Zahavi és Weiner 2020). Malpiedi és mtsai. (2013) tanulmányai alapján az antitestek variábilis fragmentumait tekintik a humán terápiák egyik legfontosabb eszközének. Az antitestek széles körű alkalmazásait használják ki különböző orvosi, gyógyszerészeti és kutatási területeken. Ezek a molekulák ugyanazt a kötődési funkcionalitást tartják fenn, mint a

teljes hosszúságú antitestek, de számos előnyös tulajdonságuk van, mint például a szövetekbe való behatolás gyorsasága, a könnyű manipuláció, az immunkomplexük gyors eliminációja és a lehetőség, hogy egyszerű expressziós rendszerekbe, például baktériumokban és élesztőben képesek termelődni.

1.3.1. Tumor terápia

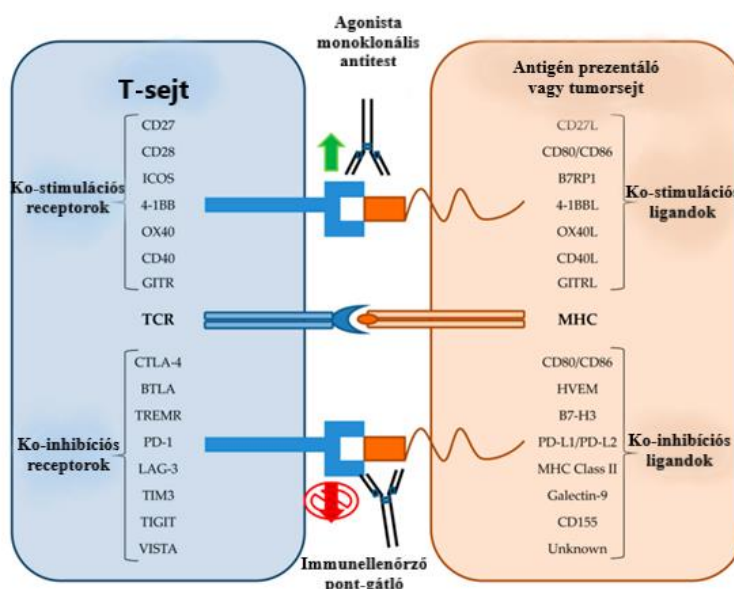
Az antitestek egyedülállóak abban a tekintetben, hogy képesek közvetlenül elpusztítani a tumorsejteket, miközben egyidejűleg a gazdaszervezet immunrendszerét is bevonják, hogy hosszan tartó effektor válaszokat fejlesszenek ki a daganat ellen. 1988-ban egy kutatócsoport azonosított egy fehérjét, a CD20-at, egy sejtfelszíni fehérjét, amely az érett B-sejtekre volt specifikus. Azt állapították meg, hogy a CD20 bőségesen expresszálódik a rákos B-sejteken non-Hodgkin-limfómában, de nem található egészséges éretlen B-sejteken. Ezért a CD20-at célzó antitest-kezelés megszüntetheti a rákos sejteket, ugyanakkor az éretlen B-sejtek maradnának az egészséges sejtek utánpótlására (Zhao és mtsai. 2022). A CD20 expressziója a rosszindulatú B-sejtek sejtfelszínén a monoklonális antitest terápia célpontjává teszi. Ezáltal, a rituximab, az Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszerengedélyezési Hivatal (FDA, *Food and Drug Administration*) által jóváhagyott, első monoklonális antitest a klinikai terápiában, és a CD20 antigént célozza meg, különböző mechanizmusokon keresztül és a CD20-at expresszáló B-sejtek kimerüléséhez vezet. Azáltal, hogy a szilárd tumorsejteken túlexpresszált antigéneket célozták meg, több antitest bizonyult hatékonynak rákterápiás célokra. Napjainkban az olyan célpontokra irányított antitestek, mint az epidermális növekedési faktor receptor, EGFR és a humán epidermiális növekedési faktor receptor 2, HER2, széles körben használatosak a klinikai gyakorlatban a mellrák kezelésére. Ezen túlmenően, jelenleg számos egyéb módszer is létezik az ellenanyagok rákterápiában való alkalmazására, beleértve az antitest-gyógyszer konjugátumokat, a bispecifikus T-sejt-kötőket és az immunellenőrzőpont-gátlókat (Henry és mtsai. 2010).

A klinikailag daganatellenes hatást Zahavi és Weiner (2020), úgy érték el, hogy monoklonális antitesteket konjugáltak különböző effektormolekulákkal, amelyek az antitestek megkötése és befogadása után a tumorsejtek halálát okozták. Az effektormolekulák lehetnek citotoxikus gyógyszerek, immunotoxinok és radionuklid szerek. Az antitest-konjugátum tervezésénél nagyon fontos a megfelelő célpont kiválasztása, amely a daganatellenes aktivitás és szelektivitás fő meghatározója. Ez alapján, a célpontoknak befogadó képességgel kell rendelkezniük az antitest megkötésekor, ahhoz, hogy a hatóanyag felengedjen. A Brentuximab

vedotin lett az első antitest-gyógyszer konjugátum, amelyet az FDA jóváhagyott 2011-ben. A tumor mikrokörnyezete számos, olyan tényezőt tartalmaz, amelyekről ismert, hogy gátolják a daganatellenes immunitás válaszreakciókat, elősegíti a tumorsejtek növekedését és angiogenezist indukál. A legrelevánsabb célpont a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) volt, amely számos szilárd daganat mikrokörnyezetében megtalálható és a tumor melletti vaszkuláris endotéliumban található receptorához (VEGFR) kötődik. A bevacizumab antitestet, amely blokkolja a VEGF receptorhoz való kötődést, számos különböző rák kezelésére engedélyezték.

1.3.1.1. Immunellenőrző pontok

A rák elleni monoklonális antitest-terápia legismertebb és leghatékonyabb típusa az immunellenőrző pontok blokkolása.



4. ábra Immunellenőrző pontok blokkolása (Zahavi és Weiner 2020)

Az immunsejtek aktiválása és szabályozása rendkívül összetett folyamat, amelyhez szükséges különféle ko-stimuláló és ko-inhibitor jelek integrálása, ahogy a 4-es ábrán is láthatjuk. Az immunellenőrzési pontok olyan gátló receptorok és útvonalak, amelyek felelősek az öntolerancia fenntartásáért és az immunválaszok modulálásáért a járulékos szövetkárosodások csökkentése érdekében. A citotoxikus T-limfocita antigén-4 (CTLA-4) volt az első T-sejt-ellenőrző pont, amelyet azonosítottak. A CTLA-4-et főként a szabályozó T-sejtek expresszálják, amelyet regulátor T-sejteknek is nevezünk (Treg). Azt feltételezték, hogy a CTLA-4 blokkolása közvetve és közvetlenül felerősítheti a tumorellenes T-sejtes választ,

azáltal, hogy inhibálja a gátló szabályzó T-sejteket és fenntartja az aktiváló jeleket a citotoxikus T-sejtek számára (Collin 2017).

A „programozott sejthalál” receptor-1 (*programmed cell death protein-1*, PD-1) egy másik gátló immunellenőrzési pont és a T-sejtek programozott sejthalál útvonalához kapcsolódik. A PD-1 egy ellenőrzőpont fehérje, amely negatívan szabályozza az immunválaszokat. Főleg T-sejteken, természetes ölüsejteken, B-limfocitákon, makrofágokon, dendritikus sejteken, mieloid sejteken és monocitákon expresszálódik. Ligandja, a PD-L1, egy transzmembrán fehérje, és főként makrofágokon, T-sejteken, B-sejteken, természetes ölüsejteken és egyes hámsejteken expresszálódik. A PD-L1 stimulálható gamma-interferonnal, amely az aktivált T-sejtekből szabadul fel. Az aktivált T-sejteken expresszált PD-1-hez kötődik, hogy elnyomja a T-sejtek citotoxikus aktivitását, és lehetővé teszi a tumorsejtek számára, hogy elkerüljék az immuntámadást. Ez azonban megfordítható a PD-1 és PD-L1 közötti interakció blokkolásával. Az FDA három PD-1 gátlót (pembrolizumab, **Nivolumab** és cemiplimab) és három PD-L1 gátlót (atezolizumab, avelumab és durvalumab) hagyott jóvá a rák kezelésére (Zhao és mtsai. 2022).

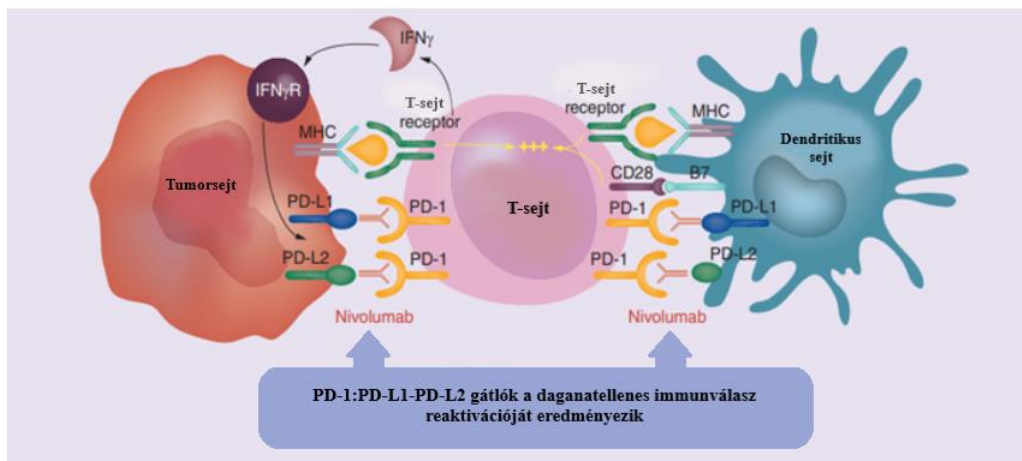
A PD-1 az effektor T-sejtek működésének fő szabályozója, ezért kulcsfontosságú ellenőrzőpontnak számít. Kimutatták, hogy a daganatsejtek felülszabályozzák a PD-1 ligandum termelését, hogy kimerítsék a tumorba beszűrődő limfocitákat. 2014-ben a PD-1 elleni monoklonális antitest a Nivolumab elnyerte az FDA jóváhagyását melanómás betegek számára, miután a CheckMate-037 klinikai vizsgálatban a betegek javuló tendenciájáról számoltak be. A későbbi klinikai vizsgálatok sikerei a Nivolumab és egy másik anti-PD-1 monoklonális antitest, a pembrolizumab engedélyezéséhez vezettek számos rosszindulatú daganat kezelés érdekében. (Raedler 2015).

A PD-1-et vagy ligandumait célzó további monoklonális antitestek szintén jól teljesítettek a klinikai vizsgálatok során. Jelen állás szerint, a monoklonális ellenanyagok a CTLA-4, PD-1, és a PD-L1 immunellenőrző pontjai számos jóváhagyást kapott az FDA által, ezáltal első helyen állnak bizonyos szolid daganatok, például a melanóma, terápiás jellegű kezelésének vizsgálataiban (Mattiuzzi és Lippi 2019).

1.4. Nivolumab (PD-1-gátló)

A kutatásunkban a Nivolumab (PD-1-gátló) antitesttel foglalkozunk, így elengedhetetlen a részletesebb bemutatása a kísérlet sikerességének céljából. A Nivolumab egy új immunológiai ellenőrzőpont-gátló, amely blokkolja a programozott sejthalál-1 (PD-1)

kölcsönhatását ligandumával, a programozott halál-ligandum 1-gyel. A Nivolumab-terápiának korlátozott, de jótékony hatásai vannak, ahogyan már fentebb is olvashattuk, olyan betegeknél, akiknél melanóma vagy nem laphámsejtes tüdőrák okozta agyi áttétet diagnosztizáltak (Matsumoto és mtsai. 2022).

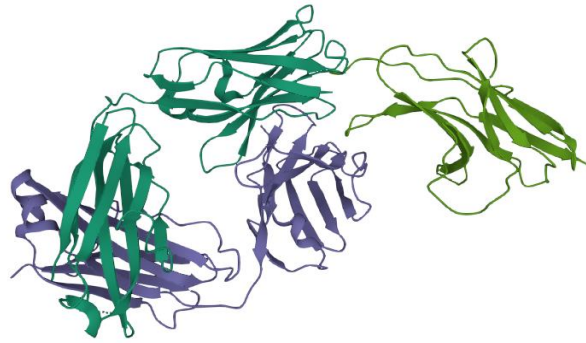


5. ábra Daganatellenes immunválasz helyreállítása Nivolumab segítségével (Brahmer, Hammers, és Lipson 2015)

A PD-1 a T-sejt-receptorok CD28 családjának tagja, és ahogy már említettük, elsősorban aktivált T-sejteken, B-sejteken és mieloid sejteken expresszálódik. A PD-1 kulcsfontosságú ligandumai közé tartozik a PD-L1 és PD-L2, amelyeket számos szövetben is indukálhatók, különösen gyulladásos citokineknek való kitettség után. A PD-L1 számos humán tumorsejteken expresszálódik, amely fontos szerepet játszik a daganatellenes immunválaszok elkerülésében. Amikor a T-sejteken lévő PD-1 megköti a PD-L1-et vagy a PD-L2-t, a T-sejt gátló jelet kap, és már nem hoz létre produktív immunválaszt, ezt a folyamatot a 5-ös ábra szemlélteti (Brahmer, Hammers, és Lipson 2015).

1.4.2. Nivolumab és PD-1-gátló komplex

A 6-os ábrán a Nivolumab monoklonális antitest- és a PD-1 fehérje komplex 3D-s ábrázolása látható, amelyen világos zöld színnel van jelölve a PD-1 fehérje, sötétzöld- és lila színnel az antitest, amelyen belül a sötétzöld szín a nehéz láncot-, a lila szín a könnyű láncot prezentálja.



6. ábra 3D Nivolumab és PD-1 komplex
(<https://www.rcsb.org/3d-sequence/5GGR?assemblyId=1>)

1.5. Monoklonális antitestek előállítására alkalmas expressziós rendszerek

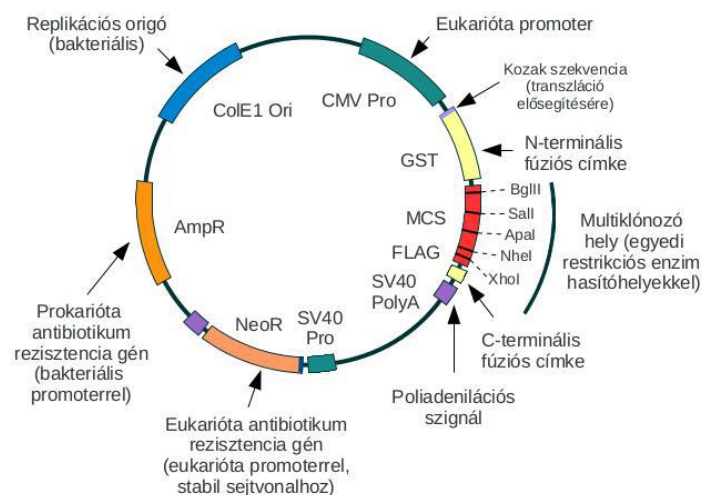
Ha megszeretnénk határozni, az emlős expressziós rendszer fogalmát a legkönnyebben úgy tudnánk kifejezni, hogy egy emlős szövetből származó sejtvonalban expresszáltatjuk a használni kívánt gént. A rendszer alapjait képzik a gazdasejt és a vele összeférhető expressziós vektor, amely tartalmazza a termeltetni kívánt fehérje gén kódoló szekvenciáját. A gén bevitelének folyamatát egy emlős sejtenyészetbe transzfekciónak nevezzük (Nyitray (szerk.) 2013).

Egy biológiai termék előállításához a gyártási folyamatnak nagyon szigorú kritériumokat kell követnie a reprodukálhatóság és kiváló minőség elérésének érdekében. A bioterápiás eljárások egyedinek tekinthetők, hiszen élő sejt kultúrákkal dolgoznak (Dahodwala és Lee 2019).

Nyitray (szerk.) (2013) alapján, emlős expressziós vektorként „shuttle” (ingázó) vektorokat használnak., amelyek tartalmazzák a baktériumban való fennmaradáshoz és szaporodáshoz szükséges elemeket, mint a transzkripcióhoz szükséges promóter, antibiotikum rezisztencia gén, *E. coli* replikon. Egy emlős expressziós vektor *in silico* módon történő ábrázolását a 7-es ábra szemlélteti. A leggyakrabban használt emlős vektorok a plazmidok, melynek egyik oka, hogy erős promótereket tartalmaznak (pl. pcDNA: CMV promóter).

A megfelelő emlős vektor megépítését követően, a vektor emlős sejtvonalba való bejuttatás transzfekció révén történik. Kétféle transzfekciót különböztetünk meg a tranziens és a stabilt. A kettő között a különbség, hogy a tranziens esetében a bejuttatott DNS vagy esetleg RNS nem épül be a gazdaszervezet genomjába, és az expresszió csak pár napig tart, előnye viszont, hogy nagyon gyors, így 12–72 óra elteltével már lehet izolálni a vizsgálni kívánt fehérjét. Ezzel szemben a stabil expresszió esetében a bejuttatott DNS beépül a genomba, és

hosszú ideig fennmarad, a sejtek fenntarthatóak és lefagyaszthatóak, illetve további előnynek számít az alacsonyabb expressziós szint, hiszen így kevésbé szor bele a sejt életműködésébe, így nem pusztul el. A gén bevitele az emlős sejtekbe megvalósítható elektroporálással, transzdukcióval, mikroinjektálással, esetleg DEAE-dextrán-mediált transzfekcióval (Nyitray (szerk.) 2013).



7. ábra Egy eukarióta expressziós vektor általános térképe (Nyitray (szerk.) 2013)

A fehérje expresszióra használt sejtvonalakat elsődleges sejtenyészetekből nyerik, többszörös passzálás után. Az orvosbiológiai kutatásokban, diagnosztikában és az immunterápiában használatos rekombináns fehérjék expresszióját a gyógyszeriparban leginkább kínai hörcsög petefészkek (CHO) sejtvonalban állítják elő. A monoklonális antitestek iránti növekvő kereslet miatt a termelési technológiák folyamatos fejlesztés alatt állnak. Egy 2020-as tanulmányból kiindulva (Tihanyi és Nyitray 2020), az FDA 2002-óta több mint 300 biogyógyszerészeti jóváhagyást engedélyezett, és azóta ez a szám folyamatosan növekedett. Manapság a CHO sejtek annyira hasznosnak bizonyulnak, hogy a 10 legjobb gyógyszer közül 7-et, köztük monoklonális antitesteket is (adalimumab, avelumab) CHO sejtvonalban expresszálnak (Yusufi és mtsai. 2017), ennek oka a sejtenyésztési folyamatok dinamikus fejlesztése, illetve a táptalajok összetételének széleskörű fejlődése mögött keresendő.

Az emlős termeltetésen alapuló rendszerek többféle eredetű sejtvonalakat használnak, az előzőleg említett kínai hörcsög petefészkek sejtjeitől (CHO), a humán embrionális vese sejteken át (HEK-293, *human embryonic kidney 293 cells*) a rágcsálók mielóma sejtekig (5T33, *murine myeloma cells*, (Manning és mtsai. 1992). Ennek ellenére, mégis a biológiai anyagok

közel 70%-át és csaknem az összes monoklonális antitestet a kínai hörcsög petefészek sejtvonallal állítják elő. Ennek oka, hogy viszonylag nagy termelőképességük van (0,1-1 g/l), emellett megfelelő növekedési fenotípust eredményeznek, így alkalmasak nagy ipari tenyésztésre. Egy másik tényező, ami miatt népszerű expressziós rendszerré váltak, hogy könnyedén alkalmazkodnak különféle kémiai közegekhez, alacsony érzékenységet mutatnak a humán vírusokkal szemben, emellett képesek humán glikolizáció végzésére. A sejtvonalat Theodore Puck izolálta 1956-ban, de azóta különböző mutációkat végeztek rajta, amelynek köszönhetően sokkal hatékonyabb fehérjetermelést biztosítanak, mint a szülői sejtvonal. Példának okáért, a CHO DG44 gazdaszervezetet, abból a célból hozták létre, hogy metabolikus markerek segítségével gyorsabbá tegye a klónszelekciót (Tihanyi és Nyitray 2020).

2. Célkitűzések

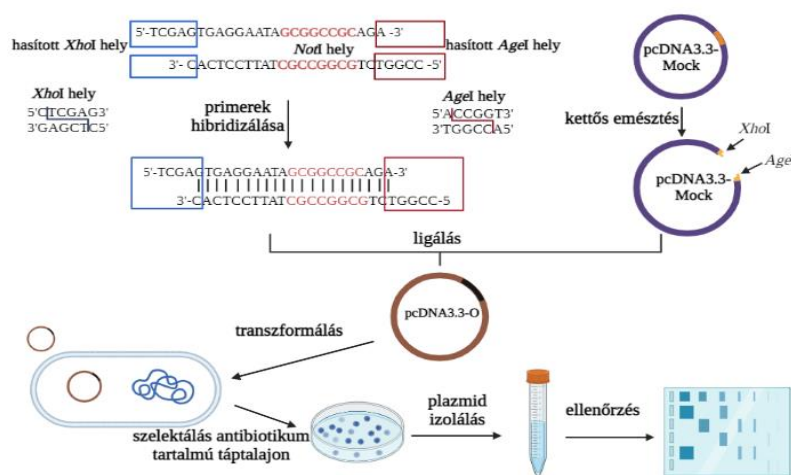
A kutatási munkánk célja egy bioszimiláris monoklonális antitest (Nivolumab) klónozása és termeltetése emlős sejtvonalban. A bioszimiláris készítmények hatása és megbízhatósága megegyezik a referencia, szabadalmazott biológiai gyógyszerével, viszont hozzáférhetőbb áron kerülnek a piacra. A kutatás sikeressége esetén, a későbbiekben más monoklonális antitestek előállításának megvalósítására is lehetne lehetőség, amelyek szintén szabadalmi jog alatt állnak és nehezen elérhetőek, megfizethetőek.

Kutatásunk része a CORAX BIONER CEU „Bioszimiláris antitestet termelő sejtvonal fejlesztése” projektnek, amelynek első lépése a bioszimiláris antitestet tartalmazó rekombináns vektorok megépítése, majd az antitest expressziójának megvalósítása emlős sejtvonalban. Ehhez a Nivolumab könnyű- és nehéz láncokat (NivoLC és NivoHC) kódoló szekvenciákat a két kiválasztott vektorba ligáljuk (pOptiVEC-MOCK, pcDNA3.3-MOCK), úgy, hogy mindkét vektorban megtalálható legyen külön-külön a könnyű- illetve a nehéz lánc génje (pOptiVEC-NivoLC, pOptiVEC-NivoHC, pcDNA3.3-NivoLC, pcDNA3.3-NivoHC, LC-*light chain*, HC-*heavy chain*). Jelen kutatásunk célja a Nivolumab nehéz láncát kódoló szekvenciának klónozása a kiválasztott expressziós vektorokba, míg a könnyű láncot a CORAX BIONER munkatársai végezték munkánkkal párhuzamosan. A jelen kutatásban létrehozott konstrukciókat a Biomérnöki Tanszékéhez tartozó BIBIRC (Biokémiai és Biotechnológiai Kutatóközpont) laboratóriumában végeztük el.

2.1. Másodlagos célkitűzések

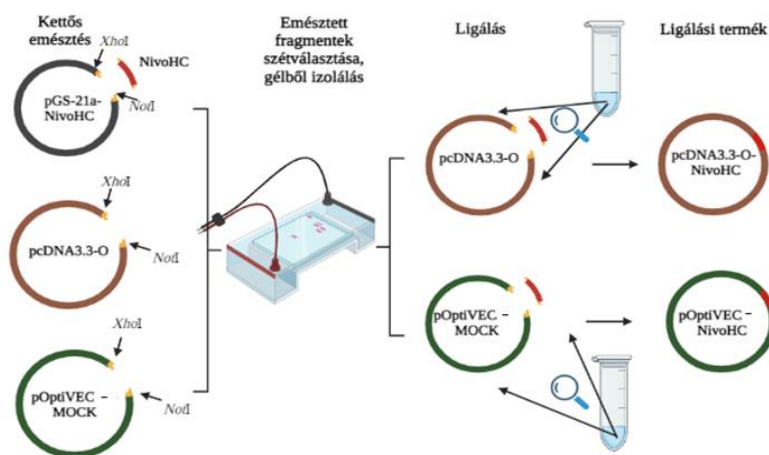
2.1.1. Expressziós vektorok megépítése

Két expressziós vektort építettünk meg (pcDNA3.3-NivoHC, pOptiVEC-NivoHC). A NivoHC szekvenciát a GenScript Biotech (Hollandia) szintetizálta az 5' illetve 3' végein *Xho*I illetve *Not*I restrikciós helyekkel. Kutatási célunk elérése érdekében a NivoHC klónozásához először létrehoztunk egy olyan pcDNA3.3-O plazmidot, amely a pcDNA3.3-MOCK és egy hibridizált oligonukleotid ligálásából származott, és tartalmazza a gén ligálásához szükséges *Xho*I és *Not*I restrikciós endonukleázok hasító helyeit. Erre azért volt szükség, mivel a NivoHC két végén ezen enzimek hasító helyei vannak jelen, és az eredeti vektor nem tartalmazza a *Not*I helyet. Ennek megoldására, terveztünk két egymással komplementer oligonukleotidot, amelyek tartalmazták az *Xho*I és *Age*I helyek között a *Not*I helyet. A primereket hibridizáltattuk egymással, majd ezt ligáltuk a megfelelő enzimekkel linearizált pcDNA3.3-MOCK plazmidba.



8. ábra A pcDNA3.3-O vektor létrehozásának folyamatábrája
(BioRender programban készítve)

A pcDNA3.3-O plazmid megépítését követően létrehoztuk a rekombináns plazmidokat, pcDNA3.3-NivoHC, pOptiVEC-NivoHC, amelyekbe a NivoHC génjét *Xho*I és *Not*I restrikciós helyek közé ligáltuk, ezen folyamatok a 8-as, illetve a 9-es ábrán láthatóak. A két vektor kombináció felhasználható a továbbiakban emlős sejtvonal ko-transzfektálására, és meghatározható, hogy mely kombináció esetén kapunk jó antitest termelő sejtvonalat.



9. ábra A rekombináns konstrukciók létrehozásának folyamatábrája (BioRender programban készítve)

2.1.2. Expresszió ellenőrzése

Az expresszió megvalósítása CHO DG44 emlős sejtvonalonban a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház Molekuláris Diagnosztikai Kutatólaboratóriumában történt, egy erre a célra kialakított laborban. Az expresszió megvalósítása a Freedom™ DG44 leírása alapján történt. A ko-transzfektálást követően a különböző sejtvonali fenntartásokból (passzálásokból) mintát vettünk a fehérje termelés ellenőrzésére SDS-PAGE-el (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézis).

3. Anyag és módszertan

3.1. Alkalmazott plazmidok felsorozása és ellenőrzése

3.1.1. A plazmidok és sejtvonali tulajdonságai

A kutatásomhoz alkalmazott anyagokat és eszközöket a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Biomérnöki Tanszékéhez tartozó Biotechnológiai és Biokémiai Kutatóközpont (BIBIRC), a CORAX-BIONER CEU, valamint a Debreceni UD-GenoMed Kft. bocsájtotta rendelkezésünkre (1-2. Táblázat). A rekombináns konstrukciók létrehozásához szükséges komponenseket VWR, Sigma, Merck, Thermo Scientific, NEB, PCR Biosystems gyártóktól vásároltuk.

1. Táblázat Az alkalmazott és létrehozott plazmidok jellemzői

Plazmid megnevezése / Mérete	Tulajdonságok	Eredet
pcDNA3.3-MOCK 5431 bp (12-es ábra)	AmpR, tartalmazza az <i>NheI</i> és <i>XhoI</i> hasító helyeket	UD-GenoMed Kft. Debrecen
pOptiVEC-MOCK 4426 bp (12-es ábra)	AmpR, tartalmazza az <i>NheI</i> és <i>XhoI</i> hasító helyeket	UD-GenoMed Kft. Debrecen
pcDNA3.3-NivoLC 6125 bp	AmpR, NivoLC kódoló szekvencia <i>NheI</i> és <i>XhoI</i> hasító helyek között (718 bp)	CORAX-BIONER CEU
pOptiVEC-NivoLC 5120 bp	AmpR, NivoLC kódoló szekvencia <i>NheI</i> és <i>XhoI</i> hasító helyek között	CORAX-BIONER CEU
pGS-21a-NivoHC 7570 bp	AmpR, NivoHC kódoló szekvencia <i>XhoI</i> és <i>NotI</i> hasító helyek között (1401 bp)	CORAX-BIONER CEU
pcDNA3.3-O 5435 bp	AmpR, tartalmazza a <i>NotI</i> restrikciós helyet <i>XhoI</i> és <i>AgeI</i> enzimek között	jelen kutatásban létrehozott
pcDNA3.3-O-NivoHC 6831 bp	AmpR, NivoHC kódoló szekvencia <i>XhoI</i> és <i>NotI</i> hasító helyek között	jelen kutatásban létrehozott
pOptiVEC-NivoHC 5789 bp	AmpR, NivoHC kódoló szekvencia <i>XhoI</i> és <i>NotI</i> hasító helyek között	jelen kutatásban létrehozott

2. Táblázat Alkalmazott sejtvonal tulajdonságai

Felhasznált sejtvonal	Genotípus	Felhasználás
<i>E. coli</i> NEB 10	$\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta\text{lacX74 galK16 galE15 e14-}\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$	klónozó sejtvonal

Az UD-GenoMed Kft. által rendelkezésünkre bocsájtott plazmidok térképének *in silico* ábrázolását a 10-es ábra szemlélteti, amelyet a SnapGene szoftver segítségével hoztunk létre. Jobb oldalon a pcDNA3.3-MOCK vektor látható a kiemelt *NheI*, *AgeI* és *XhoI* restrikciós hasító

helyekkel együtt, a bal oldalon pedig a pOptiVEC-MOCK vektor ábrázolása jelenik meg az *NheI*, *XhoI* és *NotI* restrikciós hasító helyekkel.



10. ábra A pOptiVEC-MOCK és pcDNA3.3-MOCK vektorok ábrázolása SnapGene szoftverrel

3.1.2. Kémiai kompetens sejtek készítése

Az *Escherichia coli* NEB 10 sejtek 16 órát nevelt tenyészetet 10 percig centrifugáljuk (*Beckman coulter-Hettich Zentrifugen*) 4000 rpm-en, majd a létrejött felülúszót elöntjük. A pelletet 10 mL jéghideg, steril 100 mM-os CaCl_2 -oldatba szuszpendáljuk, és 15 percre jégre helyezzük. A CaCl_2 elősegíti a plazmid sejtfalhoz való kötődését, a pozitív töltésű Ca^{2+} -ok vonzzák a negatív töltésű DNS-t. A szuszpenziót 10 percig centrifugáljuk 4000 rpm-en, majd a felülúszót elöntjük. Ezt követően, 1 mL jéghideg 100 mM-os CaCl_2 -oldatban rázatva szuszpendáljuk a sejteket, majd glicerint adunk hozzá. Ez a szuszpenzió már kémiaailag kompetens sejteket tartalmaz. Végezetül, 100 μL -ként steril mikrocentrifuga tubusba szétosztjuk és -80°C -on tároljuk.

3.1.3. Kémiai transzformálás

A sikeres génbevitelhez először ún. kompetens sejteket kellett létrehoznunk, amelyet a 3.1.2. fejezetben tárgyaltunk. Első lépésként, 50 μL kémiai kompetens *Escherichia coli* NEB 10 sejtekhez, 1 μL (pcDNA3.3-MOCK) plazmid DNS-t mértünk, majd 30 percig tároltuk jégen. A hőshockot inkubátor (*TS-Thermo Shaker*) segítségével végeztük, amely 42°C -on 1 perc 30 másodpercig tart, ezalatt a sejtmembrán fellazult (fluidabb lesz), és a plazmid könnyedén beáramolhat. Ezt követően, 10 percig jégen tároltuk így a membrán visszanyerheti a merevségét. A továbbiakban 450 μL Luria-Bertani táplevest mértünk hozzá, 37°C -on

inkubáltuk rázatva (*TS-Thermo Shaker*) 250 rpm-en, egy órán keresztül, ez az idő az antibiotikum-rezisztencia kifejeződését segíti elő. Végezetül 100 µg/mL ampicillint tartalmazó Luria-Bertani (LB) lemezre szélesztettük a sejteket és 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A megfelelő értékelés céljából, egy kontroll sejtszuspenziót is szélesztettünk ellenőrzés céljából.

3.1.4. Plazmid izolálás

A plazmid izolálást a GeneJet Plasmid Miniprep Kit (*Thermo Fisher Scientific*) segítségével végeztük. A mikrocentrifuga tubusban (eppendorf) lecentrifugáltunk 4,5 mL-t a leoltott 16 órát nevelt kultúrából. A sejteket 14.000 rpm-en 2 percig centrifugáltuk (*Beckman coulter-Hettich Zentrifugen*), majd a felülúszót elöntöttük, és reszususpendáltuk a pelletet 250 µL reszususpendáló oldattal. Az oldathoz további 250 µL lízis puffert adtunk, és 4-6x felfordítottuk a tubust, amíg viszkózus szuszpenziót kaptunk. Ezt követően, 350 µL semlegesítő oldatot adtunk a mintához, és 4-6x gyengéden megfordítottuk a tubust, majd centrifugáltuk 5 percig, 14.000 rpm-en. A szuszpenziót GeneJet oszlopra pipettáztuk nagy odafigyeléssel, hogy elkerüljük a kicsapódott fehérjék átpipettázását. Ismét centrifugáltuk 1 percig, 14.000 rpm-en, majd a felülúszót elöntöttük, és visszahelyeztük az oszlopot a tubusba. A következő lépésként, 500 µL mosófolyadékot pipettáztunk a GeneJet oszlopra, centrifugáltuk 1 percig, majd elöntöttük a felülúszót, és visszahelyeztük az oszlopot a tubusba, ezt a folyamatot 2x ismételtük meg. A felülúszót ismét elöntöttük és centrifugáltuk 2 percig 13.000 rpm-en, hogy eltávolítsuk a mosófolyadékot, majd hagytuk száradni, míg az etanol elpárolog. Áthelyeztük az oszlopot egy új mikrocentrifuga tubusba, és 40 µL eluáló oldatot (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) pipettáztunk az oszlopra, inkubáltuk 2 percig szobahőmérsékleten, majd centrifugáltuk 2 percig 14.000 rpm-en. A DNS-t -20°C-on tároltuk, és agaróz gélelektroforézissel (BioRad, lásd. 3.1.6. fejezet) ellenőriztük a plazmid DNS jelenlétét.

3.1.5. Plazmidok ellenőrzése emésztéssel

A próba emésztést a New England Biolabs (NEB) *Pst*I enzimmal végeztük. Az emésztési reakció összetétele: 1 µL plazmid, 1 µL 10X NEBuffer™ r3.1 puffer, 0,3 µL *Pst*I (20 U/ µL) enzim, kiegészítve 10 µL térfogatig molekuláris tisztaságú vízzel. Ezt követően, 37°C-on inkubáltuk egy órán keresztül, majd agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük.

3.1.6. Agaróz gélelektroforézis

1%-os agaróz gél elkészítéséhez kimértünk 0,5 g agarózt, amelyet kiegészítettünk 50 mL-ig 1x TAE (Trisz-acetát-EDTA) pufferrel. Felmelegítettük az elegyet, amíg az agaróz felolvad, és hozzáadtunk 2,5 µL Red Safe DNS festéket. A felolvasztott agarózt beleöntöttük a gél tartó kádba, belehelyeztük a fésűt és várunk, amíg megszilárdul. A DNS mintákat 6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) segítségével vittük fel a zsebekbe. Az első zsebbe 1 kb DNS molekulásúly markert (Thermo Fisher Scientific) pipettáztunk. Ezt követően 90 V-on 35 percig futtattuk, és végezetül UV-fény alatt tettük láthatóvá a DNS sávokat. A gélelektroforézist a BioRad gyártótól származó eszközökkel végezzük.

3.2. A pcDNA3.3-O vektor létrehozása

3.2.1. Az oligonukleotidok hibridizálása

A pcDNA3.3-O vektor létrehozása során terveztünk két primert, amelyek egymás komplementerei, és tartalmazzák a *NotI* restrikciós enzim helyét *XhoI* és *AgeI* enzimek között. Az oligonukleotidokat 10 mM hibridizáló pufferben (10 mM Tris, pH 7,5–8,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) oldottuk fel. Ezt követően a primereket hibridizáltattuk, amelyhez összemértük a primerek ekvimolekuláris elegyét (100 mM), és 95°C-on inkubáltuk 10 percig, majd a berendezést kikapcsolva (*Beckman coulter-Hettich Zentrifugen*), fokozatosan hagytuk visszahűlni (kb. 45 perc). A hibridizált primereket 2,5 térfogat jéghideg etil-alkohollal kezeltük, -20°C-on tartottuk 1 órát, és centrifugáltuk 14.000 rpm-en 4°C-on 10 percig. A csapadékot 1 mL jéghideg 70%-os etil-alkohollal mostuk, centrifugáltuk 14.000 rpm-en 4°C-on 5 percig. A pelletet szárítottuk az etanol eltávolítása érdekében, és 20 µL eluáló pufferrel (10 mM Tris, pH 7,5–8,5) oldottuk fel. A hibridizációhoz alkalmazott primerek szekvenciáit és tulajdonságait mutatja a 3-as Táblázat.

3. Táblázat Primerek tulajdonságai

Primer neve	Primer szekvencia, 5'-3'	T _m , °C
<i>XhoI</i> -F-pcDNA	TCGAGTGAGGAATAGCGGCCGCAGA	60,3
<i>AgeI</i> -R-pcDNA	CCGGTCTGCGGCCGCTATTCCTCAC	59,7

3.2.2. A vektor emésztése

A vektor emésztését az *XhoI* és *AgeI* (New England BioLabs-NEB) enzimekkel végeztük. A protokoll szerint egy steril mikrocentrifuga tubusba összemértünk 14 μL ultra tiszta vizet, 4 μL 10X NEBrCutSmartTM puffert, 1 μL *XhoI* (20 U/ μL) enzimet, ugyanúgy 1 μL *AgeI* (5 U/ μL) enzimet és végül 20 μL plazmidot (pcDNA3.3-MOCK). Az emésztési mixet egy órán keresztül inkubáltuk 37°C-on. Az emésztés ellenőrzésére agaróz gélelektroforézist használtunk.

3.2.3. A vektor gélből izolálása

A vektor emésztését követően gélből izoláltuk az érdekelt DNS fragmentet, amelyet a GeneJet Gel Extraction Kit (*Thermo Fisher Scientific*) alkalmazásával valósítottunk meg. A vektor gélből izolálása során kivágtuk az agaróz gélből az emésztett DNS-t (pcDNA3.3-MOCK- *XhoI-AgeI*), amelyhez DNS-kötő puffert adtunk hozzá 1:1 arányban. Ezt követően, 60°C-on inkubáltuk 10 percig, amíg felolvadt a gél, közben 1-2 percenként átforgattuk a tubust. Az elegyet DNS-kötő GeneJet oszlopra helyeztük, 1 percig centrifugáltuk 12.000 rpm-en, előtöttük a felülúszót. A továbbiakban 700 μL mosófolyadékot adtunk a mintát tartalmazó oszlophoz, centrifugáltuk 1 percig 12.000 rpm-en, majd a felülúszót ismét előtöttük. Az üres GeneJet oszlopot centrifugáltuk 2 percig 14.000 rpm-en a maradék etanol eltávolítása érdekében. Az oszlopot áthelyeztük egy 1,5 mL mikrocentrifuga tubusba, 30 μL eluáló oldatot pipettáztunk a membránra, 2 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd centrifugáltuk 2 percig 14.000 rpm-en. A DNS-t -20°C- on tároltuk.

3.2.4. DNS koncentrációk meghatározása

A DNS koncentráció meghatározását Qubit 2.0 Fluoriméter (*Invitrogen*) készülék segítségével állapítottuk meg a QubitTM dsDNA BR Assay Kit-et használva. A 200x -os dsDNA BR Reagent fluoreszcens festéket 1x-re hígítottuk dsDNA BR pufferrel 200 μL végtérfogatban. A mixet vortexeltük (*Star Lab*), majd 199 μL mix-hez 1 μL DNS mintát pipettáztunk, szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 percig, majd a fluoriméter segítségével meghatároztuk a minta DNS tartalmát.

3.2.5. Ligálás

A DNS fragmentek koncentrációjának meghatározását követően (pcDNA3.3-O) a ligálási reakcióban a hibridizált oligonukleotid és plazmid arányt 20:1-hez használtuk, figyelembe véve a vektor és az inszert méreteket is.

A ligálási reakciót 20 µL végtérfogatban végeztük, amelynek összetétele 9,2 ng hibridizált oligonukleotid, 100 ng nagy fragment, 1X T4 DNS-ligáz puffer, 1 U T4 DNS ligáz enzim (*Thermo Fisher Scientific*), amelyet kiegészítettünk 20 µL-ig ultra tiszta vízzel. A ligálási reakciót 16°C-on végeztük egy éjszakán keresztül.

3.2.6. Transzformálás

A ligálási termék transzformálását a 3.1.3. *fejezetben* ismertetett kémiai transzformálás alapján végeztük, azzal a különbséggel, hogy 100 µL kémiai kompetens sejtekhez (*Escherichia coli* NEB 10) 20 µL ligálási terméket adtunk (pcDNA3.3-O hibridizált oligonukleotid), valamint 1 óra helyett, 2 órán keresztül rázattuk 37°C-on a transzformálási mixet. Ezt követően a sejteket szélesztettük 100 µg/mL ampicillin tartalmú LB táptalajra, és 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.

3.2.7. A pcDNA3.3-O rekombináns konstrukció ellenőrzése

A transzformált telepekből plazmidokat izoláltunk, annak érdekében, hogy ellenőrizzük, hogy sikerült-e az inszert beépülése a plazmidba. A plazmid izolálást a GeneJet Plasmid Miniprep Kit (*Thermo Fisher Scientific*) segítségével végeztük, ennek lépéseit 3.1.4-es *fejezetben* tárgyaltuk. Az izolálást követően a plazmidokat restrikciós enzimekkel emésztettük, és a kapott fragmentek alapján határoztuk meg a ligálás eredményét. A plazmidok emésztését az *XhoI*, *NotI*, *AgeI*, *NotI-PstI* (New England BioLabs-NEB) enzimekkel végeztük. Az emésztési reakciók összetételét mutatja a 4-es táblázat.

Az emésztési mixet egy órán keresztül inkubáltuk 37°C-on. Az emésztés ellenőrzésére agaróz gélelektroforézist használtunk.

4. Táblázat Emésztési reakciók összetétele

	<i>Xho</i> I	<i>Not</i> I	<i>Age</i> I	<i>Not</i> I- <i>Pst</i> I	Mennyisé- gek
Plazmid neve	pcDNA 3.3-O	pcDNA 3.3-O	pcDNA 3.3-O	pcDNA 3.3-O	1 µL
Puffer neve	10X NEB rCutSmart Buffer™	10X NEBuffer™r3. 1	10X NEBuffer™r2 .1	10X NEBuffer™r3 .1	1 µL
Enzim neve	<i>Xho</i> I (20U/µL)	<i>Not</i> I (10U/µL)	<i>Age</i> I (5U/µL)	<i>Not</i> I (10U/µL) <i>Pst</i> I (20U/µL)	3 U
	ultra steril víz	ultra steril víz	ultra steril víz	ultra steril víz	10 µL-ig

3.3. Rekombináns konstrukciók létrehozása (pcDNA3.3-O-NivoHC és pOptiVEC-NivoHC)

3.3.1. Az inszert és a vektor DNS előkészítése

A pGS-21a-NivoHC plazmid tartalmazza a NivoHC gént, az elején és végén restrikciós hasító helyekkel ellátva, amelyek segítségével kivágtuk a vektorból az érdekelt fragmentet, majd ezt követően gélből izoláltuk.

A pGS-21a-NivoHC, pcDNA3.3-O és pOptiVEC-MOCK vektorok esetén az emésztést az *Xho*I és *Not*I NEB-es enzimekkel végeztük. 30 µL végtérfogatba dolgoztunk, amely tartalmaz 3 µL 10X NEBuffer™ r3.1 puffert, 1 µL *Xho*I (20 U/ µL), 1 µL *Not*I (10 U/µL) enzimet és 25-25 µL plazmidokat.

3.3.2. DNS koncentrációk meghatározása és ligálás

A DNS koncentrációk meghatározását szintén a Qubit 2.0 Fluoriméter (*Invitrogen*) készülék segítségével állapítottuk meg, a protokollt a 3.2.4-es fejezetben tárgyaltuk. A DNS koncentrációk eredményét az 5-ös Táblázat mutatja.

A ligálási reakciókat 20 µL végtérfogatban végeztük az inszert (NivoHC): vektor arány 3:1, figyelembe véve a DNS fragmentek hosszúságát is. A pcDNA3.3-O-NivoHC rekombináns vektor létrehozása esetén összemértünk 77,33 ng kis fragmentet (NivoHC), 100 ng nagy fragmentet (pcDNA3.3-O), 1x T4 DNS-ligáz puffert, 1 U T4 DNS ligáz enzimet (*Thermo Fisher Scientific*), amelyet kiegészítettünk 20 µL-ig ultra tiszta vízzel.

5. Táblázat A kis- és nagy fragment DNS koncentrációi

Fragmentek megnevezése	DNS koncentráció, ng/ μ L
pOptiVEC-<i>Xho</i>I-NotI	102
pcDNA3.3-O-<i>Xho</i>I-NotI	104
NivoHC-<i>Xho</i>I-NotI	83

A pOptiVEC-NivoHC ligálásához, összemértünk 95 ng kis fragmentet (NivoHC), 100 ng nagy fragmentet (pOptiVEC-MOCK), 1X T4 DNS-ligáz puffert, 1 U T4 DNS ligáz enzimet (*Thermo Fisher Scientific*), amelyet kiegészítettünk 20 μ L-ig ultra tiszta vízzel. A ligálási reakciókat 16°C-on végeztük egy éjszakán keresztül.

3.3.3. Rekombináns konstrukciók ellenőrzése

3.3.3.1. Kolónia PCR

A transzformált telepekből kolónia PCR-t (*polymerase chain reaction*, polimeráz láncreakció) végeztünk (*ESCO.Swift MiniPro*), annak érdekében, hogy kiválasszuk a rekombináns vektorokat. A reakcióhoz szükséges anyagokat a 6-os Táblázat, a felhasznált primerek tulajdonságait a 7-es Táblázat foglalja össze. A felhasznált PCR-programot a 8-as Táblázat mutatja be, illetve a reakcióhoz szükséges puffer és enzim a PCR Biosystems gyártótól származott.

6. Táblázat Kolónia PCR szükséges anyagok

Kolónia PCR	
Szükséges anyagok	Mennyiségek
5x PCR Bio Reakciós puffer (tartalmazza a dNTP-t és MgCl ₂ -t)	10 μ L
PCR BioTaq DNS polimeráz enzim (5U/ μ L)	0,3 μ L
Felső primer (10 mM)	2 μ L
Alsó primer (10 mM)	2 μ L
Templát	1 telep
Ultra tiszta víz	34,7 μ L
Végtérfogat	50 μL

7. Táblázat Primerek tulajdonságai

Primer neve	Primer szekvencia	T _m , °C
10 mM Np Nivo Hc felső primer	GGCCGCCATGACTCGACTAAC	60,3
10 mM Cp Nivo Hc alsó primer	TCACTTGCCCAGAGACAGGC	59,7

8. Táblázat PCR program

Lépések	Hőmérséklet	Idő	Ciklusok
Kezdeti Denaturáció	95°C	4 perc	1
Denaturáció	95°C	15 másodperc	30
Anellálás	55°C	15 másodperc	
Polimerizáció	72°C	1 perc	
Végső polimerizáció	72°C	7 perc	1

A PCR reakciót követően, agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az amplifikált termékek méreteit.

3.3.3.2. Ellenőrzés restrikciós emésztéssel

A továbbiakban, izoláltuk az adott telepől a rekombináns DNS-t, a plazmid izolálás módszerét 3.1.4. fejezetben olvashattuk. Az izolálás befejeztével, emésztettük a rekombináns DNS-t különböző restrikciós enzimek segítségével, és agaróz gélelektroforézissel végeztük az ellenőrzést. A pcDNA3.3-O-NivoHC esetében két emésztést végeztünk 10 µL végtérfogatban, *XhoI* – *NotI* és *NotI*-*PstI* NEB-es enzimekkel. A reakcióhoz szükséges anyagokat a 9-es Táblázat foglalja össze.

9. Táblázat pcDNA 3.3-O – NivoHC emésztési protokoll

<i>XhoI</i> – <i>NotI</i>	<i>NotI</i> – <i>PstI</i>	Mennyiségek
pcDNA 3.3-O-Nivo HC	pcDNA 3.3-O-Nivo HC	2 µL
10X NEBuffer™ r3.1	10X NEBuffer™ r3.1	1 µL
<i>XhoI</i> (20 U/µL)	<i>NotI</i> (10 U/µL)	2,5 U
<i>NotI</i> (10 U/µL)	<i>PstI</i> (20 U/µL)	5 U
ultra steril víz	ultra steril víz	10 µL-ig kiegészítve
Végtérfogat		10 µL

A pOptiVEC-NivoHC esetében *XhoI-NotI* NEB-es enzimekkel végeztük az emésztést 10 µL végtérfogatban. A reakcióhoz szükséges mennyiségeket a 10-es Táblázat alapján alkalmaztuk ebben az esetben is. Az emésztési reakciókat 37°C-on végeztük 1 órán keresztül, majd a kapott fragmenteket agaróz gélelektroforézissel választottuk el, és UV fényben vizualizáltuk.

3.5. A Nivolumab expressziójának ellenőrzése SDS-PAGE-el

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk a ko-transzfektálás sikerességéről a 90% életképességet elérő expressziós mintákból ellenőriztük a Nivolumab termelését SDS-PAGE (*Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) módszerrel (BioRad).

Az első lépés a gélöntéséhez szükséges kamra összeszerelése, majd ezt követte a futtató (*running*) gél összemérése. Az ellenőrzés során 12%-os futtató gélét készítettünk. A futtató- és koncentráló (*stacking*) gél összetevőit a 10-es Táblázat tartalmazza. A megfelelő mennyiségek összemérését követően mikropipetta segítségével a két üveglap közé pipettáztuk az oldatot, majd desztillált vizet adagoltunk a tetejére. A következő lépésben összemértük a koncentráló gél összetevőit, amelyet a már megszilárdult futtató gél tetejére pipettáztunk, majd belehelyeztük a fésűt, amely a mintafelvivő zsebek kialakításáért felelős.

10. Táblázat Az SDS-PAGE gél összetevői

SDS-PAGE	12%-os Futató (<i>running</i>) gél (10 mL- re)	Koncentráló (<i>stacking</i>) gél
Szükséges anyagok és mennyiségek	30%-os akrilamid oldat 4,0 mL	30%-os akrilamid oldat 1 mL
	1,5 M Trisz-HCl oldat pH 8,8; 2,5 mL	0,5 M Trisz-HCl oldat pH 6,8; 500 µL
	-	10%-os SDS oldat 40 µL
	10%-os tetrametil-etilén- diamin oldat (TEMED) 4 µL	10%-os tetrametil-etilén- diamin oldat (TEMED) 4 µL
	10%-os ammónium perszulfát (APS) 100 µL	10%-os ammónium perszulfát (APS) 40 µL
	desztillált víz 3,3 mL	desztillált víz 1,67 mL

A minták előkészítését követően 20 µL mintához pipettáztunk 4 µL 6x-os redukálószer tartalmazó minta kezelő puffert, majd 98°C-on 7 percig inkubáltuk.

Miután a koncentrálnó gél is megfelelően megszilárdult, behelyeztük az elektroforetikus-cellába, illetve kádba, és a fésűt óvatosan kihúztuk a gélből. Ezt követően 1x SDS futtató pufferrel töltöttük fel, a felhasznált oldatok összetevőit a 12-es Táblázat tartalmazza. A kezelt mintákból 10 µL-ert vittünk fel a zsebekbe. Az első és utolsó zsebbe 5 µL molekulasúly markert (*PageRuler™ Prestained Protein és Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific*) pipettáztunk. Az elektroforézist 90 V-feszültséggel indítottuk el, amíg a festék elérte a futtató gél határát, majd ezt követően 120 V-on futtattuk, amíg a gél alját el nem érte a festék.

A fehérjesávok vizualizálása érdekében az elektroforézist követően a gél festékoldatba helyeztük (11-es Táblázat), és 30 percig 300 rpm-en rázató (*Heidolph titramax 100*) segítségével ráztuk. A következő lépésként festéktelenítő oldatba helyeztük szintén 30 percig ráztuk, majd végül desztillált vízben tároltuk.

11. Táblázat Az SDS-PAGE során használt oldatok összetevői

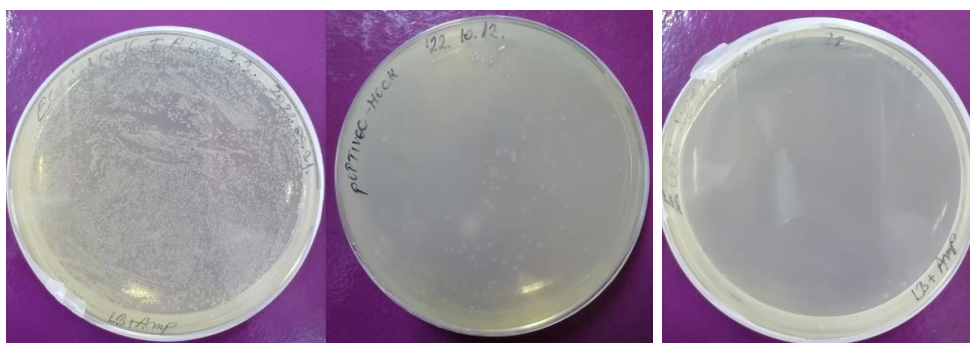
Felhasznált oldatok	Anyagok/Mennyiség
10x SDS-futtató puffer	Trisz-bázis 30,2 g Glicin 144 g SDS 10 g
Festékoldat	0,24% Coomassie Brilliant Blue R 250 50% Metanol 9,6% Ecetsav
Festéktelenítő oldat	50% Metanol 9% Ecetsav
Minta kezelő puffer	0,125 M Trisz-Cl pH 6,5 2% SDS 20% Glicerol 0,01% Brómfenolkék 5% Merkaptoetanol

4. Eredmények és értékelésük

Kutatásunk során a Nivolumab monoklonális antitest klónozását és expresszióját valósítottuk meg a CHO DG44 sejtvonalban. Ennek érdekében első lépésben felszaporítottuk és ellenőriztük a rendelkezésünkre álló plazmidokat (pcDNA3.3-NivoLC, pOptiVEC-NivoLC, pGS-21-NivoHC, pcDNA3.3-MOCK és pOptiVEC-MOCK). Ezt követően létrehoztuk a pcDNA3.3-O plazmidot, amelybe bevittük a NivoHC klónozásához szükséges *NotI* restrikciós enzim hasító helyét. A pcDNA3.3-O megépítése után, létrehoztuk a pcDNA3.3-O-NivoHC és pOptiVEC-NivoHC rekombináns plazmidokat.

4.1. Az alkalmazott plazmidok felszaporozása és ellenőrzése

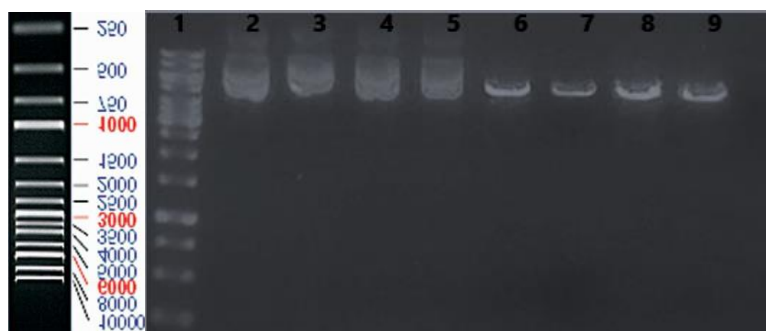
A plazmidok felszaporítása érdekében a transzformálás során kémiai kompetens *Escherichia coli* NEB 10 sejtekhez adtuk hozzá a plazmid DNS-eket (pcDNA3.3-MOCK, pOptiVEC-MOCK), és a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezre szélesztettük a sejteket, amelyet a 11-es ábra szemlélteti



11. ábra A pcDNA 3.3. MOCK illetve a pOptiVEC-MOCK transzformálása *Escherichia coli* NEB 10 sejtekbe, valamint a kontroll.

A 11-es ábra alapján elmondhatjuk, hogy a transzformálás a pcDNA3.3-MOCK, illetve pOptiVEC-MOCK plazmidok esetében sikeres volt, hiszen csak azok a telepek tudtak kifejlődni az ampicillines táptalajon, amelyek tartalmazták az antibiotikum rezisztencia gént. Ellenőrzés céljából egy kontroll mintát is készítettünk, amelyen a sikeres transzformálás esetén nem fejlődhetett ki egy telep sem.

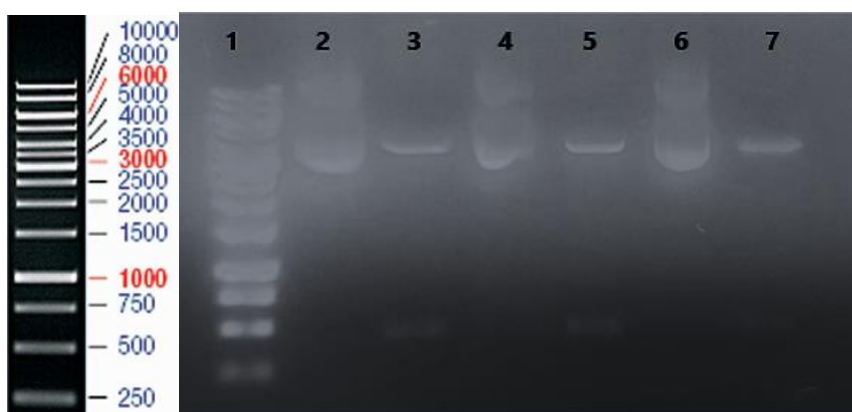
A transzformált telepekből plazmid DNS izolálást végeztünk, és különböző restrikciós enzimekkel hasítottuk, annak céljából, hogy ellenőrizzük a plazmidok megfelelő méreteit. Az izolálás és az emésztés sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.



12. ábra Az izolált és emésztett pcDNA3.3-MOCK plazmidok futtatásának eredménye 1%-os agaróz gélen

1. 1 kb. DNS marker (Thermo Fisher Scientific); 2,3,4,5. pcDNA3.3-MOCK (1,2,3,4-es telep); 6,7,8,9. pcDNA3.3-MOCK-PstI (1,2,3,4).

A 12-es ábra a pcDNA3.3-MOCK izolálásának és emésztésének eredményét mutatja, melynek alapján elmondható, hogy az egyszeresen emésztett plazmid mérete megfelel a számított plazmid méretének, amely 5431 bp.



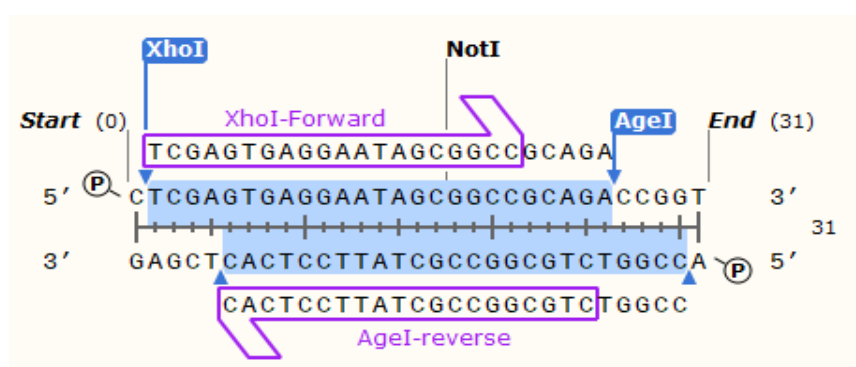
13. ábra Az izolált és emésztett pOptiVEC-MOCK plazmidok futtatásának eredménye 1%-os agaróz gélen. 1. 1 kb. DNS marker (Thermo Fisher Scientific); 2,4,6. pOptiVEC3.3-MOCK (1,2,3-as telep); 3,5,7. pOptiVEC3.3-MOCK - XhoI-KpnI (1,2,3).

A 13-as ábra a pOptiVEC-MOCK izolálásának és XhoI-KpnI enzimekkel való emésztésének eredményét mutatja, melynek alapján elmondható, hogy a kapott nagy fragment (3930 bp) és kis fragment (496 bp) méreteinek összege megfelel a pOptiVEC-MOCK plazmid méretének (4426 bp).

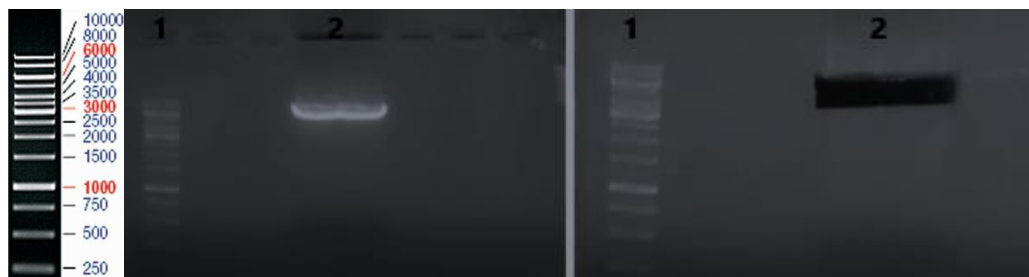
A többi plazmiddal is hasonlóan jártunk el, de azokat a gélképeket nem tettük bele a dolgozatba, mivel ezek előkészületek. A kutatásban használt rekombináns plazmidokat (az LC-t tartalmazókat) szekvenálással ellenőrizték a Corax Bioner munkatársai, és úgy bocsátották a rendelkezésünkre

4.2. A pcDNA3.3-O vektor létrehozása

A plazmidok felszorozását és ellenőrzését követően, annak érdekében, hogy klónozni tudjuk a NivoHC gént a pcDNA3.3-MOCK vektorba, először tartalmaznia kell a *NotI* restrikciós enzim hasító helyét. Erre azért van szükség, mivel a NivoHC az *XhoI-NotI* enzimek között található a pGS-21a-NivoHC plazmidban. A *NotI* helyet egymással komplementer oligonukleotidokkal juttattuk be a pcDNA3.3-MOCK plazmidba, melyek *XhoI-AgeI* enzimek között tartalmazzák a *NotI* helyét, ez a 14-es ábrán látható. Az oligonukleotidokat hibridizáltattuk egymással, és felhasználtuk a ligálási reakcióban az anyag és módszertanban leírtak alapján.



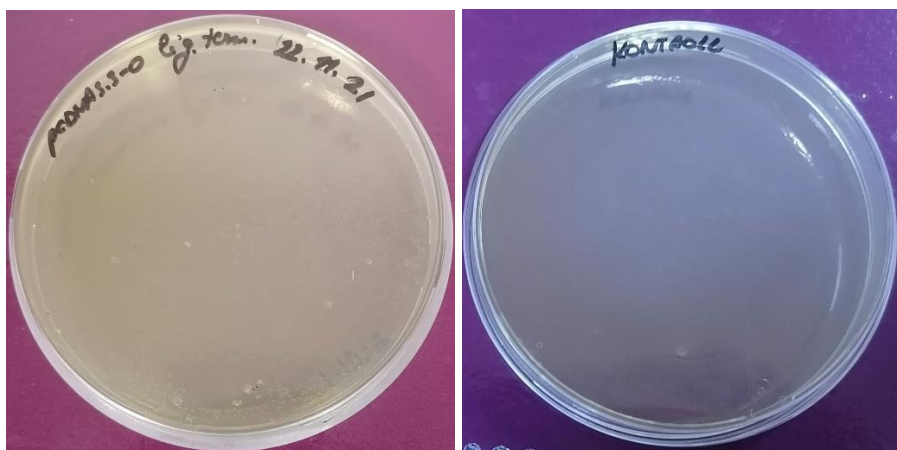
14. ábra A hibridizált oligonukleotidok szemléltetése (SnapGene)



15. ábra A pcDNA3.3-O vektor futtatásának és gélből való izolálásának eredménye 1%-os agaróz gélen. 1. 1 kb. DNS marker (Thermo Fisher Scientific); 2. pcDNA3.3-O.

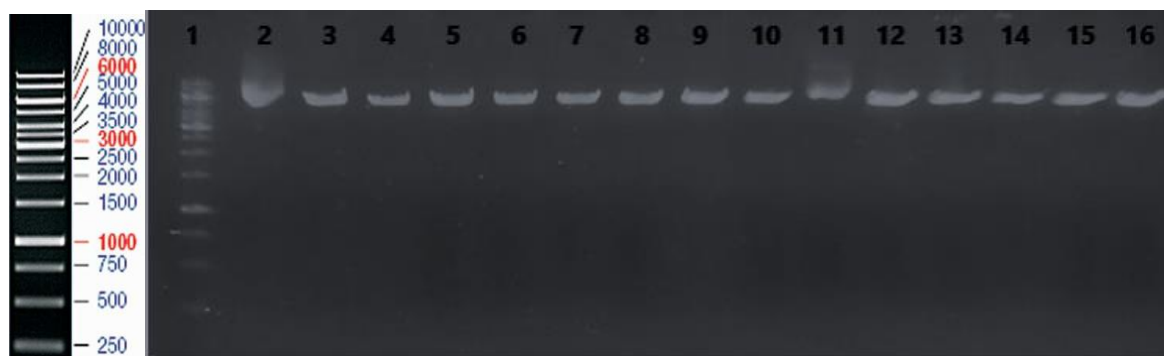
A pcDNA3.3-MOCK vektort *XhoI-AgeI* enzimekkel emésztettük, hogy komplementer ragadós végek keletkezzenek a hibridizált primerek végeivel.

A pcDNA3.3-MOCK vektort *XhoI-AgeI* enzimekkel emésztettük, hogy komplementer ragadós végek keletkezzenek a hibridizált primerek végeivel. A vektor kettős emésztésének és gélből való izolálásának eredményét mutatja a 15-ös ábra, valamint a ligálási termék transzformálásának eredményét a 16-os ábra.



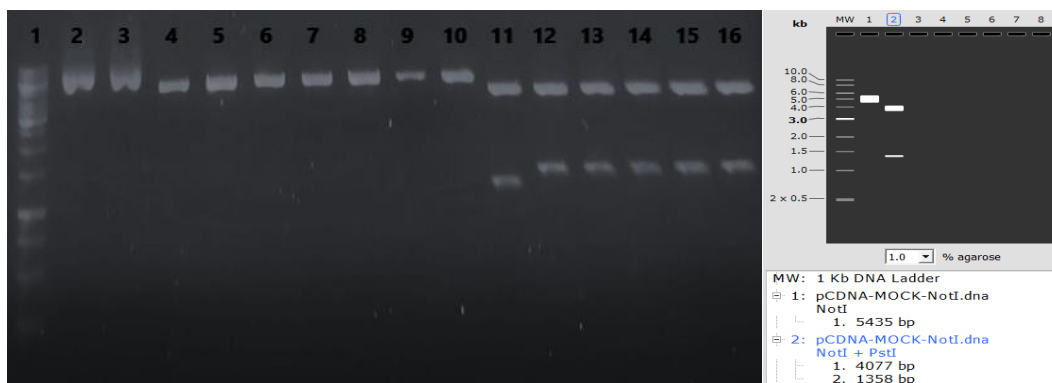
16. ábra A pcDNA3.3-O vektor ligálási termék transzformálásának eredménye; a jobb oldalon egy kontroll minta látható.

A ligálási termék transzformálását követően, a hibridizált oligonukleotidot tartalmazó plazmidok ellenőrzését az *Xho*I, *Not*I, *Age*I, *Not*I-*Pst*I emésztésekkel végeztük. Az emésztések eredményeit a 17-es és a 18-as ábrák szemléltetik.



17. ábra A pcDNA3.3-MOCK és pcDNA3.3-O emésztés (*Xho*I, *Age*I) futtatásának eredménye 1%-os agaróz gélen. 1. 1 kb. DNS marker (Thermo Fisher Scientific); 2. pcDNA3.3-MOCK; 3. pcDNA3.3-MOCK-*Xho*I; 4,5,6,7,8,9. pcDNA3.3-O-*Xho*I (1,2,3,4,5,6-os telep); 10. pcDNA3.3-MOCK-*Age*I; 11,12,13,14,15,16. pcDNA3.3-O-*Age*I (1,2,3,4,5,6-os telep).

A 17-es ábra alapján látható, hogy a pcDNA3.3-MOCK és a pcDNA3.3-O vektor emésztése az *Xho*I és *Age*I. A számított plazmid mérete 5435 bp, amelyet a gélképen egyszeres emésztés során lehet megállapítani, ugyanis a cirkuláris plazmid nem teljesen a méretének megfelelő helyen migrál a gélben alakjából adódóan, hiszen a gélképen látható, hogy lineáris fragmenteket kaptunk az egyes emésztések során 11-es zsebben található minta kivételével (1 telepből származó plazmid), szemben a 2. oszlopban található pcDNA3.3-MOCK cirkuláris plazmiddal. Az emésztés eredménye arra enged következtetni, hogy a ligálási reakció megfelelően ment végbe.



18. ábra A pcDNA3.3-MOCK és pcDNA3.3-O emésztés (NotI, NotI-PstI) futtatásának eredménye 1%-os agaróz gélen. 1. 1 kb. DNS marker (Thermo Fisher Scientific); 2. pcDNA3.3-MOCK; 3. pcDNA3.3-O; 4,5,6,7,8,9. pcDNA3.3-O-NotI (1,2,3,4,5,6-os telep); 10. pcDNA3.3-MOCK- NotI-PstI; 11,12,13,14,15,16. pcDNA3.3-O-NotI-PstI (1,2,3,4,5,6-os telep).

A NotI és a NotI-PstI kettős emésztés alapján következtethetünk, hogy a pcDNA3.3-MOCK vektor NotI-PstI kettős emésztése, illetve a hibridizált primerekkel való ligálása sikeres volt. A leírtakat, a 18-as ábra szemlélteti, amely alapján elmondható, hogy a termék mérete (4–9-ig) megfelel a hibridizált oligonukleotidokat tartalmazó vektor méretének (5435 bp), illetve a kettős emésztés esetében (12–16-ig) a kihasadt fragment megfelelő méretet eredményezett. A szimulált és a gélben migrált DNS méretek megfelelnek egymásnak az előbb tárgyalt minták esetén. Ugyanakkor mindkét gélen látható, hogy a 11-es minta esetén nem volt sikeres a ligálás, más méretű fragmentet kaptunk, mint a várt kis fragment mérete.

4.3. Rekombináns konstrukciók létrehozása

A pcDNA3.3-O vektor megépítését, a rekombináns konstrukciók (pcDNA3.3-O-NivoHC és pOptiVEC-NivoHC) létrehozása követte. Az első lépés az inszert és a vektor DNS előkészítése, amely során NotI-PstI restrikciós enzimeket használva, emésztést végeztünk. Mindhárom vektort (pGS-21a-NivoHC, pcDNA3.3-O, pOptiVEC-MOCK) párhuzamosan emésztettük, majd gélből izoláltuk a megfelelő méreteket (19. ábra). A plazmidok emésztései során ragadós végeket hoztunk létre, amelyek komplementerek az inszert 5'-3' ragadós végeivel.

Az emésztéseket követően meghatároztuk a DNS koncentrációkat a kis (NivoHC-XhoI-NotI és nagy fragmentek esetén (pOptiVEC-XhoI-NotI, pcDNA3.3-O-XhoI-NotI), melyet az 5-ös Táblázatba foglaltunk össze. Továbbá, összemértük a ligálási reakciókat, az anyag és módszertan 3.3.2-es fejezetében leírtak alapján, majd a továbbiakban transzformálást végeztünk, ezt a 20-as ábra szemlélteti.

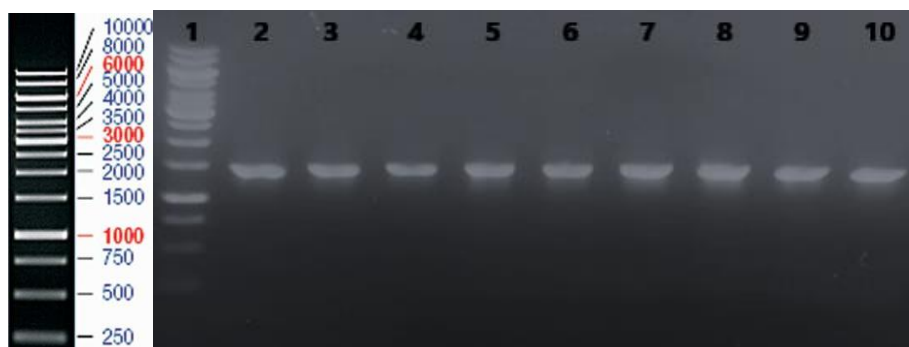


19. ábra A pOptiVEC-MOCK emésztési termék gélből izolálása



20. ábra A ligálási termék transzformálásának eredménye *E. coli* NEB sejtekben. Bal oldali ábra pcDNA3.3-O-NivoHC, jobb oldali ábra pOptiVEC-MOCK-NivoHC feltételezett rekombináns plamidokat tartalmazza.

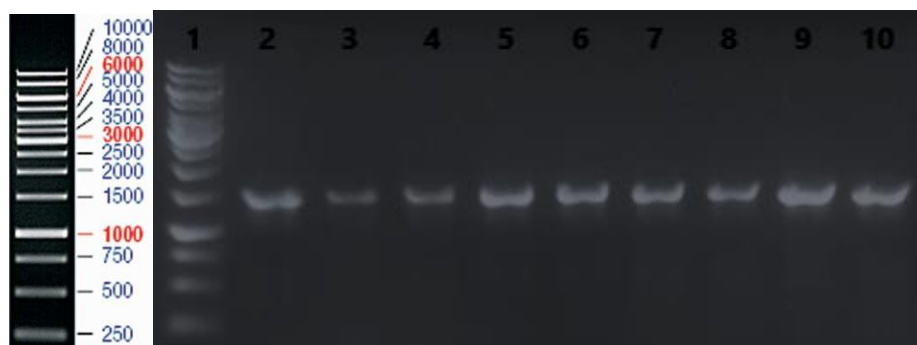
A ligálási reakciókat a rekombináns plazmidok ellenőrzése követett, amelyet kolónia PCR segítségével valósítottunk meg, amelynek során felszaporítottuk a telepekből a NivoHC-t kódoló szekvenciát specifikus primerek segítségével, majd ezt követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az amplifikált termékek méreteit.



21. ábra A kolónia PCR ellenőrzése 1%-os agaróz gélén pcDNA3.3-O-NivoHC esetén
1. 1 kb. DNS marker (Thermo Fisher Scientific); 2–10. pcDNA3.3-O-NivoHC (1,2,3,4,5,6,7,8,9-es telepek).

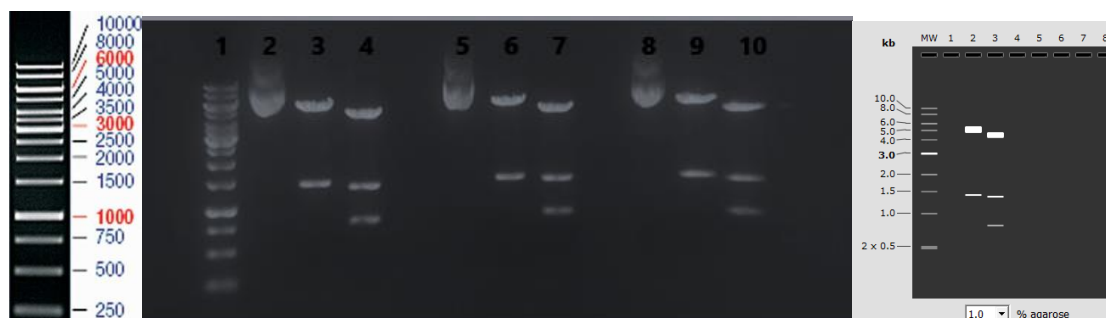
A pcDNA3.3-O-NivoHC eredményeit a 21-es ábra, míg a pOptiVEC-NivoHC eredményeit a 22-es ábra szemlélteti, amelyek alapján az amlifikált termék 1401 bp-nál jelent meg a gélben. Ez a méret megfelel a NivoHC méretének.

Az kolónia PCR eredményei alapján, izoláltuk a megfelelő telepekből a rekombináns DNS-t, ezt követően emésztettük különböző restrikciós enzimek segítségével, és végső lépésként agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a konstrukciók sikerességét.



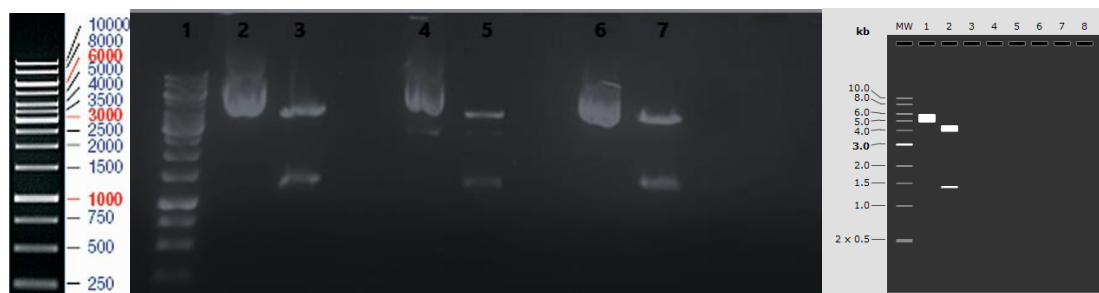
22. ábra A kolónia PCR ellenőrzése 1%-os agaróz gélen pOptiVEC-NivoHC esetén
1. 1 kb. DNS marker (Thermo Fisher Scientific); 2–10. pOptiVEC-NivoHC (1,2,3,4,5,6,7,8,9-es telep).

A pcDNA3.3-O-NivoHC rekombináns DNS esetében a kettős emésztéseket az *XhoI*-*NotI* és *NotI*-*PstI* enzimekkel végeztük, amelyet a 23-as ábra szemléltet. A pOptiVEC-NivoHC esetében *XhoI*-*NotI* enzimekkel végeztük az emésztést (24-es ábra).



24. ábra pcDNA3.3-O-NivoHC emésztett termék ellenőrzése 1%-os agaróz gélen, valamint szimulálva SnapGene programban. 1. 1 kb. DNS marker (Thermo Fisher Scientific); 2,5,8. pcDNA3.3-O-NivoHC (1,2,3-as telep) 3,6,9. pcDNA3.3-O-NivoHC-*XhoI*-*NotI* (1,2,3-as telep); 4,7,10. pcDNA3.3-O-NivoHC-*NotI*-*PstI* (1,2,3-as telep).

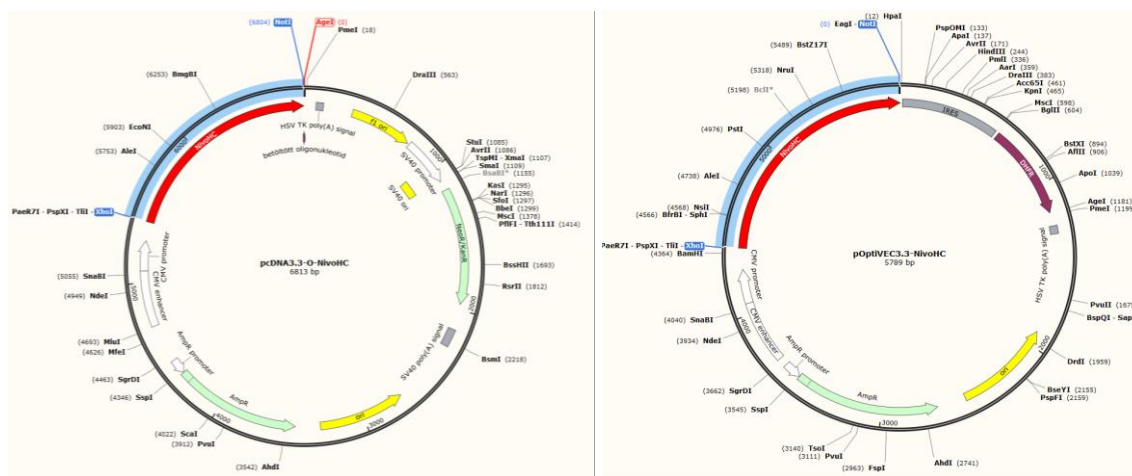
A 23-as ábra alapján, elmondhatjuk, hogy a klónozás sikeres volt, hiszen a kihasadt kis fragmentek méretei a 3,6,9. zsebekben megfelel a NivoHC 1401 bp méretének. Annak érdekében, hogy eldöntsük, hogy a gén a megfelelő helyre épült be a vektorba, elvégeztük *NotI*-*PstI* emésztést, amelynek során három fragmentet kellett kapjunk (4,7,10. zsebek).



A jobb oldali ábra mutatja, a SnapGene programban szimulált emésztési eredmények mintázatát, amely megfelel a bal oldali ábrán található mintázatnak.

A 24-es ábra alapján elmondható, hogy az izolált plazmidokból kihaladt az 1401 bp-nak megfelelő NivoHC termék, tehát a klónozás sikeres volt a pOptiVEC plazmid esetében is.

A jelen kutatásban kiválasztott rekombináns plazmidokat szekvenálással is ellenőrizték a Corax Bioner munkatársai, és csak ezt követően használták fel a CHO sejtek kótranszfektálására.

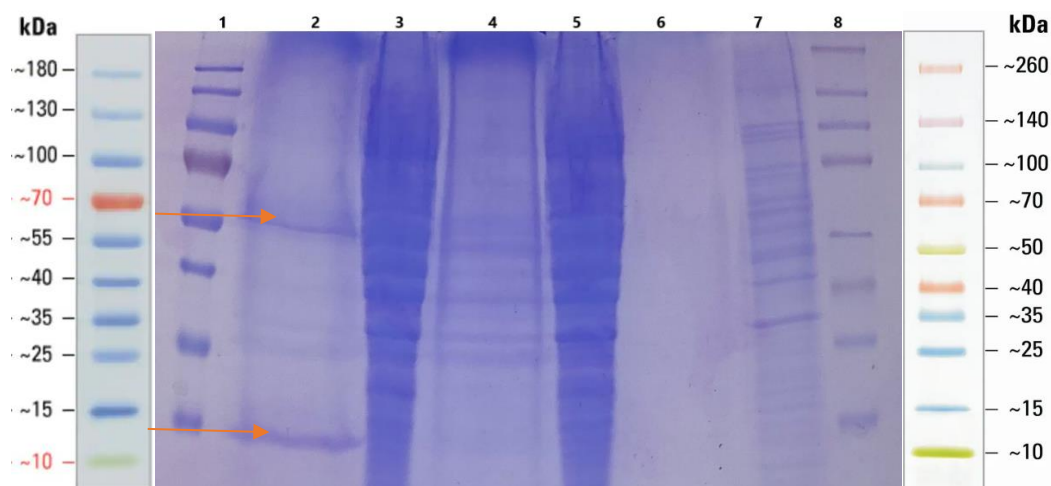


4.4. Nivolumab expressziója és ellenőrzése SDS-PAGE-el

A CHO DG44 sejtek fenntartását és ko-transzfektálását a Molekuláris Diagnosztikai Kutatólaboratórium (Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház) sejt kultúrákkal foglalkozó részlegén végezték a projekt keretein belül. CHO sejt vonalat gyakran alkalmaznak antitestek előállítására, például az Okagawa és mtsai. (2017) által leírt tanulmányban létrehozták a

szarvasmarha PD-1 patkány-szarvasmarha kiméra monoklonális 5D2 antitestet (Boch5D2) CHO DG44 sejtekben. Emellett, a Nivolumab Európai Gyógyszerügynökség (EMA, *European Medicines Agency*) alkalmazási előírásában a forgalomban található antitestet CHO sejtekben állították elő (Ema, 2017.)

A ko-transzfektálás lényege, hogy az antitest két láncát (könnyű és nehéz) külön plazmidokon ajánlott bejuttatni a sejtekbe, annak érdekében, hogy szelekciót biztosítsunk mindkét lánc esetén. Ezért a pOptiVEC-NivoLC és pcDNA3.3-NivoHC, valamint pOptiVEC-NivoHC és pcDNA3.3-NivoLC kombinációkat használtuk. Ezeket a vektorokat ugyancsak (pcDNA-LC, pcDNA3.3-HC, pOptiVEC-LC) sikeresen alkalmazták anti-TNF- α antitest termelésére CHO-DG44 sejtvonalonban (Voronina és mtsai. 2016). A transzfektálást követően ELISA (enzimhez kötött immunszorbens próba) módszerrel követik az antitestek mennyiségét a különböző időpontokban.



6. ábra A Nivolumab CHO DG44 sejtvonalon való expressziójának ellenőrzése 12%-os SDS PAGE-en. 1. Molekulasúly marker (Page Ruler Prostaíned Protein); 2,3. pOptiVEC-NivoHC és pcDNA3.3-NivoLC kombinációjából származó felülúszó és sejt; 4,5. pOptiVEC-NivoLC és pcDNA3.3-NivoHC kombinációjából származó felülúszó és sejt; 6,7. pOptiVEC-NivoLC és pcDNA3.3-NivoHC kombinációjából származó felülúszó és sejt 3. passzálás; 8. Molekulasúly marker (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder).

Amíg a módszer beállításán dolgoztak, addig az antitestek termelésének sikerességét vagy hiányát SDS-PAGE módszerével ellenőriztük, amelynek segítségével képet kapunk a termelőő fehérjék megfelelő méreteiről. Ehhez a különböző passzálások során ko-transzfektált sejt kultúrákból mintát vettek, és rendelkezésünkre bocsátották.

A két kombinációból származó mintákat centrifugáltuk, a felülúszót töményítettük (Labconco-CentriVAP DNA Concentrator), majd ezeket és a sejteket is külön kezeltük

merkaptóetanolt tartalmazó minta kezelő pufferrel, majd 12%-os gélen futtattuk. A Nivolumab könnyű láncának mérete 23,38 kDa, míg a nehéz láncának mérete 49 kDa körüli.

A 33-as ábra a bioszimiláris Nivolumab expressziójának eredményét mutatja redukáló SDS-PAGE-n. Az ábrán a 2 és 3-as zsebekben a pOptiVEC-NivoHC és pcDNA3.3-NivoLC (1 transzfektálás), valamint 4 és 5-ös zsebekben a pOptiVEC-NivoLC és pcDNA3.3-NivoHC (2 transzfektálás) kombinációból származó minták futásának eredménye látható a 7. passzalásból. 55 és 70 kDa között megjelenik egy fehérje sáv és jellegzetesebb a sejtes mintában. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a Nivolumab könnyű és nehéz lánc is megtalálható az 1-es transzfektálás esetén.

5. Következtetések

Kutatásunkat a CORAX BIONER CEU antitest termelő sejtvonal fejlesztés projektjének keretein belül végeztük, amelynek célja a bioszimiláris Nivolumabot termelő sejtvonal létrehozása volt. A kutatás keretein belül megvalósítottuk két rekombináns vektor megépítését. Ehhez először a rendelkezésünkre álló pcDNA3.3-MOCK vektorból, sikeresen létrehoztunk egy általunk megtervezett, *NotI* restrikciós endonukleáz hasító helyet tartalmazó plazmidot, pcDNA3.3-O, amely a NivoHC klónozásához szükséges. Az pcDNA3.3-O vektor megépítésének sikerességét különböző restrikciós endonukleázokkal való emésztésének során ellenőriztük. A különböző kombinációjú emésztések eredményei arra engednek következtetni, hogy sikeres volt a *NotI* hely bejuttatása a vektorba *XhoI* és *AgeI* helyek közé.

Következő lépésben megvalósítottuk a pcDNA3.3-O-NivoHC és pOptiVEC-NivoHC rekombináns plazmidokat szubklónozást alkalmazva, ugyanis a szintetizáltatott NivoHC gén a pGS-21a-NivoHC plazmidban *XhoI* és *NotI* restrikciós helyek között található. A rekombináns vektorok létrehozásának sikerességét *XhoI* és *NotI* enzimekkel ellenőriztük. Az emésztések során a rekombináns vektorokból kihasadt a NivoHC méretének megfelelő méretű DNS fragment.

Végző lépésként az expresszió sikerességét SDS-PAGE módszerrel végeztük, amely alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Nivolumab könnyű- és nehéz lánc is, megfelelő méretben termelődött, és megtalálható a táplevesben és a sejtes mintában is.

Végző következtetésként elmondható, megvalósítottuk a Nivolumab bioszimilárisának klónozását, és a CHO DG44 sejtvonal alkalmas a Nivolumab bioszimilárisának termelésére. A kutatás további céljai közé tartozik a termelt antitest tisztítása és glikozilációjának vizsgálata.

Bibliográfia

- Bank, RCSB Protein Data. é. n. „3D PFV: 5GGR”. Elérés 2022. április 22. <https://www.rcsb.org/3d-sequence/5GGR?assemblyId=1&fbclid=IwAR03dFua7B8wujqE0AP0neYAiOY0iJbbY-Axe5iJy2YPncm2cbeyW2VCr9U>.
- Böttinger, Katharina, Wolfgang Esser-Skala, Marius Segl, Christoph Herwig, és Christian G. Huber. 2022. „At-Line Quantitative Profiling of Monoclonal Antibody Products during Bioprocessing Using HPLC-MS”. *Analytica Chimica Acta* 1207: 339813. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339813>.
- Brahmer, Julie R., Hans Hammers, és Evan J. Lipson. 2015. „Nivolumab: Targeting PD-1 to Bolster Antitumor Immunity”. [Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fon.15.52](http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fon.15.52). Future Medicine Ltd London, UK. London, UK. 2015. 03. 23. <https://doi.org/10.2217/fon.15.52>.
- Chiu, Mark L., Dennis R. Goulet, Alexey Teplyakov, és Gary L. Gilliland. 2019. „Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics”. *Antibodies* 8 (4): 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>.
- Collin, Matthieu. 2017. „Immune checkpoint inhibitors: the battle of giants”. *Pharmaceutical Patent Analyst* 6 (4): 137–39. <https://doi.org/10.4155/ppa-2017-0015>.
- Dahodwala, Hussain, és Kelvin H Lee. 2019. „The Fickle CHO: A Review of the Causes, Implications, and Potential Alleviation of the CHO Cell Line Instability Problem”. *Current Opinion in Biotechnology, Pharmaceutical Biotechnology - Chemical Biotechnology*, 60 (december): 128–37. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.011>.
- Gábor Katona, Rita Ambrus, Ildikó Csóka, Piroska Szabóné Révész, és Ehrlich Paul. (2017) „*Monoklonális antitest tartalmú termékek fejlesztésének szempontjai az előállítástól a készítmények formulálásáig*” 61. 579–587.
- Genazzani, Armando A., Giovanni Biggio, Achille Patrizio Caputi, Mario Del Tacca, Filippo Drago, Roberto Fantozzi, és Pier Luigi Canonico. 2007. „Biosimilar Drugs”. *BioDrugs* 21 (6): 351–56. <https://doi.org/10.2165/00063030-200721060-00003>.
- Henry, Carole, Marina Deschamps, Pierre-Simon Rohrlich, Jean-René Pallandre, Jean-Paul Rémy-Martin, Mary Callanan, Alexandra Traverse-Glehen 2010. „Identification of an Alternative CD20 Transcript Variant in B-Cell Malignancies Coding for a Novel Protein Associated to Rituximab Resistance”. *Blood* 115 (12): 2420–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-229112>.
- Manning, L. S., J. D. Berger, H. L. O'Donoghue, G. N. Sheridan, P. G. Claringbold, és J. Harvey Turner. 1992. „A Model of Multiple Myeloma: Culture of 5T33 Murine Myeloma Cells and Evaluation of Tumorigenicity in the C57BL/KaLwRij Mouse”. *British Journal of Cancer* 66 (6): 1088–93. <https://doi.org/10.1038/bjc.1992.415>.
- Matsumoto, Yoshiyasu, Takuto Sasaki, Yuki Kondou, Sotaro Oshida, Taro Suzuki, Yasuyuki Nakamura, Norihiko Kudara, Yosuke Akamatsu, és Yuichi Sato. 2022. „Surgical Treatment of Metastatic Brain Tumor from Gastric Cancer during Therapy with

- Nivolumab: A Case Report”. *Interdisciplinary Neurosurgery* 28: 101503. <https://doi.org/10.1016/j.inat.2022.101503>.
- Mattiuzzi, Camilla, és Giuseppe Lippi. 2019. „Current Cancer Epidemiology”. *Journal of Epidemiology and Global Health* 9 (4): 217–22. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>.
- Nyitray (szerk.), László. 2013. *Géntechnológia és fehérjemérnökség*. Budapest: Eötvös Loránd Tudományegyetem.
- Okagawa, Tomohiro, Satoru Konnai, Asami Nishimori, Naoya Maekawa, Ryoyo Ikebuchi, Shinya Goto, Chie Nakajima, és mtsai. 2017. „Anti-Bovine Programmed Death-1 Rat–Bovine Chimeric Antibody for Immunotherapy of Bovine Leukemia Virus Infection in Cattle”. *Frontiers in Immunology* 8: 650. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00650>.
- „opdivo-epar-product-information_hu.pdf”. é. n. Elérés 2023.04.17. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_hu.pdf.
- Raedler, Lisa A. 2015. „Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma”. *American Health & Drug Benefits* 8 (Spec Feature): 180–83.
- Ruffolo, Jeffrey A., Jeremias Sulam, és Jeffrey J. Gray. 2022. „Antibody Structure Prediction Using Interpretable Deep Learning”. *Patterns* 3 (2): 100406. <https://doi.org/10.1016/j.patter.2021.100406>.
- Tihanyi, Borbála, és László Nyitray. 2020. „Recent Advances in CHO Cell Line Development for Recombinant Protein Production”. *Drug Discovery Today: Technologies* 38: 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>.
- Voronina, E. V., Y. A. Seregin, N. A. Litvinova, V. I. Shvets, és R. R. Shukurov. 2016. „Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti-TNF α antibody based on a CHO cell line”. *SpringerPlus* 5 (1): 1584. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3213-2>.
- Yusufi, Faraaz Noor Khan, Meiyappan Lakshmanan, Ying Swan Ho, Bernard Liat Wen Loo, Pramila Ariyaratne, Yuansheng Yang, Say Kong Ng, és mtsai. 2017. „Mammalian Systems Biotechnology Reveals Global Cellular Adaptations in a Recombinant CHO Cell Line”. *Cell Systems* 4 (5): 530–542.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.04.009>.
- Zahavi, David, és Louis Weiner. 2020. „Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy”. *Antibodies* 9 (3): 34. <https://doi.org/10.3390/antib9030034>.
- Zhao, Li-ping, Jun-hu Hu, Die Hu, Hao-jie Wang, Chang-gang Huang, Ru-hua Luo, Zhao-huang Zhou, Xin-yun Huang, Tian Xie, és Jian-shu Lou. 2022. „Hyperprogression, a Challenge of PD-1/PD-L1 Inhibitors Treatments: Potential Mechanisms and Coping Strategies”. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 15: 112949. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112949>.