



37. ORSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA 2025

37. OTDK Biológia Szekció

Ipilimumab monoklonális antitest expressziója HEK293 humán sejtvonalban



SAPIENTIA
ERDÉLYI MAGYAR
TUDOMÁNYEGYETEM
Csíkszeredai Kar

Hallgató: Gudor Szilárd - *Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar, Biomérnöki Tanszék, Génsebészet szak, IV. évfolyam (2023-ban)*

Témavezetők:

dr. Orbán Csongor, egyetemi docens

dr. Salamon Pál, egyetemi tanársegéd

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda

Szeged

2025. április 15–17.



corax-bioner ceu
biotechnology



SPITALUL JUDEȚEAN
DE URGENȚĂ MIERCUREA CIUC
CSÍKSZEREDAI MEGYEI
SÜRGŐSSÉGI KÓRHÁZ



PÉCSI
TUDOMÁNYEGYETEM

Tartalomjegyzék

Kivonat	3
Rövidítések jegyzéke	4
1. Irodalmi áttekintés	5
1.1. Bevezető	5
1.2. Immunterápia	6
1.3. Immun ellenőrzőpont	7
1.4. Monoklonális ellenanyagok szerkezete	8
1.5. Monoklonális ellenanyagok hatásmechanizmusa	10
1.6. Antitestek gyártása	11
1.7. Monoklonális antitestek piaca	13
2. Célkitűzés	14
3. Anyagok és módszerek	15
3.1. Felhasznált anyagok, alkalmazott eszközök és berendezések	16
3.2. Az Ipilimumab mAb génjét tartalmazó vektor konstrukciók ellenőrzése	19
3.2.1. Ipilimumab pOptiVec expressziós vektor	19
3.2.2. Ipilimumab pcDNA3.3 expressziós vektor	22
3.3. CaCl ₂ alapú kotranszfekció HEK293 humán sejtvonalban	23
3.3.1. HEK293 humán sejtvonal előkészítése a kotranszfekcióhoz	23
3.3.2. Ipilimumab LC és HC régiót tartalmazó DNS mixek kotranszfekciója HEK293 sejtvonalba	24
3.3.3. HEK293 sejtek összegyűjtése	26
3.3.4. Ipilimumab kotranszfekció, expresszió sikerességének kimutatása SDS-PAGE módszerrel	27
4. Eredmények és kiértékelésük	28
4.1. Az Ipilimumab mAb génjét tartalmazó vektor konstrukciók ellenőrzése	28
4.1.1. pOptiVec Ipilimumab LC és HC expressziós vektor	28
4.1.2. pcDNA3.3 Ipilimumab LC és HC expressziós vektor	31
4.2. CaCl ₂ alapú kotranszfekció HEK293 humán sejtvonalban	34
5. Következtetések	36
6. További célkitűzések	37
Köszönetnyilvánítás	38
Irodalomjegyzék	39

Kivonat

A korábbi kezelési normákhoz képest, mint a kemoterápia, sugárkezelés vagy a műtét, a tumorelles immunterápia jelentős javulást eredményezett a betegek számára túlélés, illetve életminőség tekintetében, mára már a rákgyógyítás új pillérévé válva. Az immunterápia fő összetevői a monoklonális antitest (mAb) alapú kezelések, melyek egyike a legfontosabb fejlesztés alatt álló biogógyszerészeti termékeknek.

A monoklonális antitestek közvetlen úton célozzák meg a daganatokat, fokozva a tumor ellenes T-sejt immun válaszokat az immun ellenőrzőpont gátlása által. A biotechnológia fejlődésének köszönhetően, a molekuláris biológiai és a génsebészeti technikák lehetővé teszik ezen monoklonális antitestek termelését főként emlős expressziós (CHO, HEK293) rendszerekben. Az előállított magas minőségű rekombináns fehérjék felhasználhatóak humán terápias készítményként.

Kutatásunk célja az Ipilimumab, a daganatos betegségek kezelésénél, immunterápiában alkalmazott immun ellenőrzőpont (CTLA-4) gátló monoklonális antitest előállítása: rekombináns DNS konstrukciók (pOptiVec/pcDNA3.3 Ipilimumab LC, pOptiVec/pcDNA3.3 Ipilimumab HC) tervezése, kotranszfektálása tranziens expresszióval humán sejtvonalba (HEK293).

A rekombináns DNS konstrukciók HEK293 sejtvonalba való bejuttatását CaCl_2 alapú transzfekcióval valósítottuk meg. A transzfekciót követően a HEK293 sejtvonalat 6 napon keresztül $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 5%-os CO_2 koncentráció mellett inkubáltuk, majd a termelt antitestet SDS-PAGE-el ellenőriztük.

Rövidítések jegyzéke

AGE – Agaróz gélelektroforézis

APC – (Antigen Presenting Cell) Antigén Prezentáló Sejt

Bp – Bázipár

CD – (Cluster of Differentiation) Sejt felszínen megjelenő differenciálódási antigének

CHO – (Chinese hamster ovary) Kínai Csíkos Hörcsög Petefészek Sejt

CTLA-4 – (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4) Citotoxikus T-Limfocita 4-es Antigén Fehérje Receptor

DC – (Dendritic Cell) Dendritikus sejt

EMA – (European Medicines Agency) Európai Gyógyszerügynökség

ELISA – (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Enzimhez Kötött Immunszorbens Próba

FDA – (Food and Drug Administration) Amerikai Egyesült Államokban működő élelmiszerbiztonsági szervezet

FPLC – (Fast Protein Liquid Chromatography) Gyors fehérje folyadékkromatográfia

HC – (High Chain) Nehéz lánc

HEK293 – (Human Embryonic Kidney 293 Cells) Humán Embrionális Vesesejtek 293

Ig – Immunoglobulin

kDa – Kilodalton

LC – (Light Chain) Könnyű lánc

mAb – (Monoclonal antibody) Monoklonális Antitest

MALDI-TOF MS – (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) Mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria

MHC – (Major Histocompatibility) Fő Hisztokompatibilitási Komplex

NK – (Natural Killer Cells) Természetes Ölősejtek

pcDNA3.3-IpiliHC – pcDNA3.3 Ipilimumab nehéz lánc gént tartalmazó expressziós vektor

pcDNA3.3-IpiliLC – pcDNA3.3 Ipilimumab könnyű lánc gént tartalmazó expressziós vektor

PD-1 – (Programmed Death-1) Programozott halál-1 receptor

pOptiVec-IpiliHC – pOptiVec Ipilimumab nehéz lánc gént tartalmazó expressziós vektor

pOptiVec-IpiliLC – pOptiVec Ipilimumab könnyű lánc gént tartalmazó expressziós vektor

SDS-PAGE – (Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis

TCR – (T-cell receptor) T-sejt receptor

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Bevezető

Az elmúlt évtizedben gyors és drámai változásokat tapasztaltunk a rákos megbetegedések kezelésében, egyre szélesebb körben elterjedté váltak az immunterápiás gyógyszerek alkalmazásai. Napjainkban a monoklonális antitest alapú immunterápiát a legfontosabb rákterápiás eljárások közé sorolják, a műtét, sugárkezelés és a kemoterápia mellett (Sun és mtsai., 2020; Zahavi és Weiner, 2020).

Az immunterápia a rák immun felügyeletének (immunosurveillance) koncepcióján alapul, ez az immunrendszer tumoros sejtekre való válaszána egyik formája, amely során a tumoros sejtek elpusztulnak. Egy másik kimenetele az immunrendszer és a rákos sejtek találkozásának egy egyensúlyi állapot kialakulása, amely során a tumort nem sikerül teljes mértékben elpusztítani, de a növekedésük leáll. A legrosszabb esetben, ha a tumorsejtek felismerése sikertelen, tumorprogresszióról beszélhetünk (Türk és Rajnavölgyi, 2017).

A rák terápiás kezelése érdekében régóta foglalkoznak az immun válasz felerősítésével. Az egyik fő korlát a rák elleni immunválasz beindításában, hogy az immunrendszer jelentős erőfeszítéseket kell tegyen a saját túl-működése ellen, amely kárt tehet az egészséges szövetekben is. Ezt az előnyt kihasználva a rák képes „elrejtőzni”, az autoimmunitás elkerülésére használt immun menekülési mechanizmusoknak köszönhetően. Ilyen mechanizmusok közé tartozik az immunsejt–intrinsic ellenőrző pontok eltérítése, melyet a T-sejtek aktivációja indukál. Egyik ilyen ellenőrzőpont a CTLA-4 (Citotoxikus T-Limfocita 4-es Antigen Fehérje Receptor), gátlásával javulást értek el áttétes melanomában szenvedő betegek kezelése során (Ribas, 2012).

A CTLA-4 egy 223 aminosavból álló fehérje, amely az immunglobulin szupercsaládhoz tartozik, T-sejt mediált citotoxicitással társul. A CTLA-4 fontos immun ellenőrzőpont (immune checkpoint), amelyek az immunrendszer működésének szabályozásában (negatív regulátor) és az autoimmun reakciók kivédésében játszik szerepet. Negatív regulátorként a tolerancia fenntartásáért a tumoros sejteket felismerő és elpusztító T-limfocitákra is gátló jeleket küld (Camacho, 2015; Szekanecz és Szekanecz, 2019).

Az onkológiában fontos mérföldköveket értek el az immun ellenőrzőpont-gátló terápia alkalmazásával, többek között a CTLA-4 gátló Ipilimumab használatával, amelyet melanoma

kezelésben alkalmaznak. Az immun ellenőrzőpont-gátló ellenanyagok hatásukat nem a rákos sejtekre fejtik ki, hanem magára a gazdaszervezet immunrendszerére (Szekanecz és Szekanecz, 2019).

Az Ipilimumab egy IgG₁ típusú humán monoklonális antitest, amely a CTLA-4 gátlás hatására fokozott T-sejtes indukcióhoz és a naiv sejtek számának a csökkenéséhez vezet, ezáltal aktiválja az immunrendszert (Camacho, 2015).

A monoklonális antitestek gyártására leggyakrabban emlős CHO (Chinese hamster ovary, Kínai Csíkos Hörcsög Petefészek Sejt), illetve humán HEK293 (Humán Embrionális Vesesejtek 293) sejteket használnak gazda szervezetnek, mivel képesek a megfelelő mennyiség termeltetésére, amely felülmúl néhány mikrobiális rendszert is és képes az emberhez hasonló glikolizációra, poszttranszlációs folyamatokra (Chng és *mtsai.*, 2015; Hunter és *mtsai.*, 2019). Minden IgG molekula 2 azonos nehéz láncú (HC) és 2 azonos könnyű láncú (LC) polipeptidből áll. A monoklonális ellenanyagot termelő sejtvonal előállítása a HEK293/CHO sejtek transzfektálásával kezdődik, amely során a transzfektált vektorok hordozzák a könnyű- nehéz láncokat és a szelekciós marker géneket is (Chng és *mtsai.*, 2015).

1.2. Immunterápia

Onkológia terén lényeges előrelépést sikerült elérni, az immunterápiai orvoslás felvirágzásával, hisz a betegek tumorellenes immunválaszának erősítésével látványos eredmények érhetőek el. Az immunterápia kezelések fellendüléséhez, illetve humán alkalmazás engedélyeztetéséhez hosszú út vezetett, az első aktív rákellenes immunterápiát William B. Coley 1898-ban hajtotta végre, azóta az immunológia nagyméretű fejlődésen esett át. Coley több mint ezer daganatos beteget kezelt élő, meg inaktivált baktérium injekció keverékével, úgynevezett “Coley’s toxin”-al (például *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens* baktériumokkal), abban a reményben, hogy erős immun és daganatellenes válaszreakciókat idéz elő. Kísérletét igazolva sikerült tartós remissziót elérnie több rosszindulatú daganatos betegségben, többek között szarkóma, limfóma és hererák esetében. Azonban a hatásmechanizmus ismeretének hiányában, valamint a betegek patogén baktériumokkal való szándékos megfertőzése következtében fellépő magas kockázat miatt a 20. században az onkológusokat arra készítette, hogy alternatív kezelési módként a műtétet és a sugárterápiát fogadják el (Fésüs, 2017; Esfahani és *mtsai.*, 2020).

A korábbi standard ellátásokhoz képest, mint az agresszív kemoterápia, a sugárkezelés, illetve a műtét általi tumoros sejtek elpusztítása helyett az orvosok, kutatók igyekeztek a kezeléseket az immunválasz felerősítésével kiegészíteni, amely csökkentett toxicitással, és nagyobb hatékonysággal járhat (Fésüs, 2017; Esfahani és mtsai., 2020).

Leghatékonyabb immunterápia a monoklonális ellenanyag vagy immun ellenőrzőpont-gátló terápia, melyeknek alapja a tumorellenes aktivitás fenntartása. Ilyen immun ellenőrzőpont a CTLA-4, illetve a PD-1 (Programmed Death-1 Receptor, Programozott halál-1 receptor) is (**1.táblázat**). Ezek az immunrendszer fontos szabályozó molekulái, részt vesznek az immunrendszer működésének és egyensúlyának a kezelésében azáltal, hogy kontrollálják a T-sejtek aktiválódását továbbá effektor funkcióját (Calabrese és mtsai., 2018; Szekanecz és Szekanecz, 2019).

Habár a monoklonális antitest terápia sikeresnek bizonyult a rák kezelésében, a klinikai rezisztencia kialakulása továbbra is komoly problémát jelent (Sun és mtsai., 2020; Zahavi és Weiner, 2020).

1. táblázat: Néhány jelentős immun ellenőrzőpont gátló terápiás mAb; EMA – (European Medicines Agency) Európai Gyógyszerügynökség; FDA – (Food and Drug Administration) Amerikai Egyesült Államokban működő élelmiszerbiztonsági szervezet (Sun és mtsai., 2020; Zahavi és Weiner, 2020)

Immun ellenőrzőpont gátlók	Célpont	Ellenanyag izotípusok	Indikáció (engedélyezés éve)
Ipilimumab	CTLA-4	Humán IgG ₁	Melanoma (2011 FDA, EMA) Veserák (2018 FDA, EMA)
Nivolumab	PD-1	Humán IgG ₁	Melanoma; Kissejtes hörgőrák Veserák; Fej-nyaki laphámrák (2014 FDA, 2015 EMA)
Pembrolizumab	PD-1	Humanizált IgG ₁	Melanoma Fej-nyaki laphámrák (2014 FDA, 2015 EMA)
Avelumab	PD-L1	Humán IgG ₁	Merkel-sejtes karcinóma (2017 FDA, EMA)
Atezolizumab	PD-L1	Humanizált IgG ₁	Nem kissejtes hörgőrák Urothelialis karcinóma (2016 FDA, EMA)
Durvalumab	PD-L1	Humán IgG ₁	Urothelialis karcinóma (2017 FDA, - EMA)

1.3. Immun ellenőrzőpont

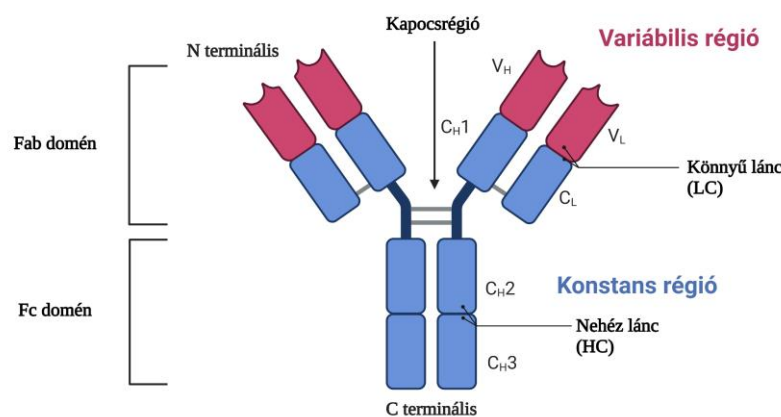
Az emberi szervezet immunrendszerének három fő rendeltetése van: a saját szerkezetek védelme, a saját és idegen komponensek elkülönítése, továbbá a tumoros sejtek növekedésének gátlása. Az immunrendszerünk idegen anyagok felismerésében, valamint az ellenük irányuló védekezésben két fő útvonal játszik szerepet: a természetes (veleszületett), illetve az adaptív (szerzett) immunitás. A természetes immunrendszer egy elsődleges, gyors és nem specifikus immunválasszal reagál főként fertőzések elleni védekező mechanizmus során. Lezajlását követően nem alakul ki immunológiai memória. A természetes immunrendszer kulcsfontosságú résztvevői a szöveti falósejtek, mint például a makrofágok és a granulociták, a természetes ölósejtek (NK), illetve a dendritikus sejtek (DC). Ezzel szemben az adaptív, vagyis a szerzett immunitás késleltetett, antigén specifikus reakció. Az adaptív immunválasz résztvevői a T és B limfociták, lezajlásukat követően immunológiai memória alakul ki (Fésüs, 2017; Kiss, 2019).

A meggyőző daganatellenes immunválasz kialakulásához számos komponensre van szükség, melyet összességében tumormimmunitási ciklusnak nevezünk. A tumorsejtek keletkezési helyén a perifériás szövetekben áramló antigénprezentáló sejtjei (APC) feldolgozzák a daganatos sejtek kijutásából eredő fehérjéket, illetve eljuttatják a nyirokrendszeren keresztül a nyirokcsomókba, ahol a fő hisztokompatibilitási komplex molekulákon (MHC) keresztül kostimulációs reakciók kíséretében bemutatják a várakozó T-sejteknek. A T-sejtek aktivációja, illetve ebből adódóan klonális szaporodásuk bekövetkezik, ezt követően a véráramon keresztül a daganatos szövetbe jutnak, ahol a felismert daganatos sejteket eliminálják miután tumorspecifikus effektor, és memória T-sejtekké alakultak. Optimális feltételek mellett ez a folyamat pozitív visszacsatolási mechanizmust idéz elő, az elpusztult tumoros sejtekből kiáramló antigének újabb T-sejt aktivációt okoznak. Tehát a T-sejtek a tumorelles immunválasz fő komponensei, mennyiségük, túltermelésük az immun ellenőrzési pontok által vannak szabályozva. Az immun ellenőrzőpontok fenntartják a szervezet homeosztázisát mivel, ha az immunrendszer hosszabb ideig van aktiválva megtámadhatja az egészséges szöveteket is, ez okból károsodást okoz (Fésüs, 2017; Kiss, 2019; Zahavi és Weiner, 2020).

Ilyen immun ellenőrzési pont a CTLA-4 T-sejt fehérje receptor, amely az immunválasz negatív szabályozásán keresztül immun ellenőrző pontként működik. Negatívan szabályozza a T-sejtek által közvetített immun válaszokat azáltal, hogy a nyirokcsomókban a T-sejt aktivációt a kezdeti fázisban blokkolja (Kiss, 2019; Pistillo és mtsai., 2020).

1.4. Monoklonális ellenanyagok szerkezete

Az antitestek az immunoglobulin (Ig) szupercsaládba tartozó nagy glikoproteinek, feladatuk az idegen antigének felismerése, semlegesítése és a további immunválasz kiváltása. Alapszerkezetük két Y alakú nehéz és két könnyű láncból tevődik össze diszulfid kötések által. Az Y ágának mindkét csúcsán a Fab kötő fragmens (Fragment antigen binding) található, amely az antigén felismeréséért felelős. A monoklonális antitest Y szerkezetének alján helyezkedik az Fc (Fragment crystallizable) régió, szerepe az antitest és az immunrendszer más komponensei között kölcsönhatások közvetítése (*lásd 1. ábra*). A nehézlánc típusai alapján az antitestek öt különböző osztályba sorolhatóak: IgA, IgD, IgE, IgG, és IgM. Az IgG típusú monomer immunoglobulin a leggyakrabban használt forma az antitest terápiában, mivel kölcsönhatásba lépnek a hozzájuk kapcsolódó FcR típussal, az Fc γ R-rel (Psimadas és *mtsai.*, 2012; Zahavi és Weiner, 2020).



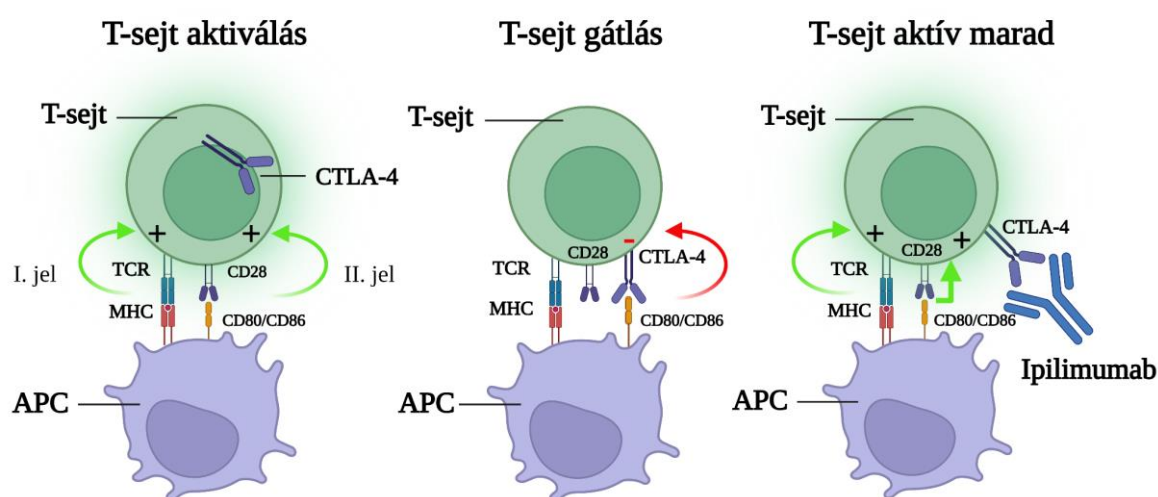
1. ábra: Monoklonális antitest szerkezete és összetevői. C terminális: effektor funkciók aktiválása, immunválasz; N terminális: antigén kötő, felismerő régió (Saeed, 2016; Lacouture és *mtsai.*, 2014; Lisi és *mtsai.*, 2022; Biorender.com segítségével szerkesztve)

Antitestek esetében a monoklonális antitestek mellett még egy típusról beszélhetünk, a poliklonális antitestek csoportjáról, mely eltér specificitás, illetve affinitás alapján. A poliklonális antitestek több különböző immunsejt felhasználásával készülnek, egy antigén több epitópját is felismerni, számos klón termeli. Ezzel szemben a monoklonális antitestek olyan ellenanyagok, amelyek kizárólag egyetlen epitóp felismerésére képesek, vagyis egyetlen B limfocita klónból származnak. Azonban a monoklonális ellenanyagok terápiás célokra

alkalmasabbnak bizonyulnak a homogenitásuk, egyetlen epitópra való nagyfokú specificitásuk és alacsony fokú kereszt aktivitásuk miatt (Lipman és mtsai., 2005; Singh és mtsai., 2020).

1.5. Monoklonális ellenanyagok hatásmechanizmusa

Az FDA által elsőként engedélyezett rák immunterápiában használatos monoklonális antitest az Ipilimumab (**1. táblázat**), amely immun ellenőrzőpontot blokkol, pontosabban a CTLA-4-et (**lásd 2. ábra**), T-sejt aktivációt és a naiv sejtek számának csökkenését eredményezve, ezáltal javulást értek el áttétes melanoma elleni alkalmazása során (Araujo és mtsai., 2015; Kiss, 2019).



2. ábra: T-sejt aktiváció és gátlás a CTLA-4 által. Az Ipilimumab a CTLA-4-hez kötődik és blokkolja a CTLA-4, illetve ligandumjai a CD80/CD86 közötti kölcsönhatást, ezáltal aktív marad a T-sejt (Lacouture és mtsai., 2014; Lisi és mtsai., 2022; Biorender.com segítségével szerkesztve)

A **2. ábrán** is látható, miképpen a teljes T-sejt aktivációhoz két jel szükséges, az elsőt a tumor antigén és a fő hisztokompatibilitási komplex kötődése váltja ki a T-sejt receptor (TCR) kapcsolatán keresztül. A második jelhez pedig a CD80/CD86 (B7) ligandum illetve a CD28 receptor közötti kapcsolódás, úgynevezett kostimuláció szükséges. A CTLA-4 T-sejt receptor a B7/CD28-család tagja, ennél fogva nagyobb affinitása következtében a T-sejt aktivációhoz szükséges B7/CD28 kapcsolatot megakadályozza, ugyanakkor ez a kapcsolat nem vezet aktiváló szignálokhoz, a T-sejt nem aktiválódik (Lacouture és mtsai., 2014; Lisi és mtsai., 2022).

1.6. Antitestek gyártása

A monoklonális antitesteket a domináns csoportját képezik a humán terápiában használt rekombináns fehérjéknek. Számos alkalmazási lehetőséggel rendelkeznek sejtbiológia, immunológia, biotechnológia és gyógyszergyártás területén. A gyártás technológia fejlődése, a genetikai manipuláció és a molekuláris biológiai technikák elérhetősége, lehetővé tette a rekombináns hibridóma sejtvonalak létrehozását a többé kevésbé meghatározott és differenciálatlan sejtek helyett. Az 1970-es évek közepén az antitestek kereskedelmi sikerének alapjait Köhler és Milstein fektette le, akik monoklonális antitestek előállítása céljából kifejlesztették a B-limfociták immortalizálásának módszerét, a hibridóma technológiát. Egér hibridómát alkalmaztak, a hibridómák olyan immortalizált, tehát halhatatlan sejtvonalak, amelyek korlátlan osztódást biztosító mielóma sejtek és antitest termelésre képes egér lépsejtek fúziójával keletkeznek. Az előállított hibridóma sejteket tovább szaporítják, melyek a következő antigénekre specifikus monoklonális ellenanyagokat termelnek, azonban a termelt antitesteket kinyerik a tápoldatból. Az immunválaszok ellenben nem elegendőek az egerekben, aminek következtében alacsony affinitású vagy nem specifikus (első generációs) mAb-okat eredményeznek (Kunert és Reinhart, 2016; Saeed és Saeed, 2016; van der Schoot és *mtsai.*, 2019).

A monoklonális antitestek előállításának egy másik módszerét, a fág megjelenítési (Phage display) technológiát, először G. Smith 1985-ben mutatta be mely által hatékonyan, gyorsan azonosíthatóak a peptidek vagy az antitest fragmentum (mint például a Fab-ok). Gregory P. Winter 1990-ben továbbfejlesztette, fágjelzett antitest könyvtárat alkalmazott a fágjelzett antitestek izolálásához és kimutatására. Ezen technikák alapján kifejlesztették az első teljesen humán, terápiás antitestet, az Adalimumab-ot, egy tumor nekrozis faktor (TNF α) ellenes humán antitestet, amelyet 2002-ben az FDA reumatoid arthritis kezelésére jóváhagyott (Saeed és Saeed, 2016; Mahmuda és *mtsai.*, 2017; Wang és *mtsai.*, 2022).

Mivel a teljes hosszúságú antitestek (150 kDa) glikolizáltak előállításukra gazdaszervezként jelenleg az emlős sejtvonalakat részesítik előnyben, amelyek lehetővé teszik az emberhez hasonló N-glikozilációt. Ezzel szemben hátrányuk a biológiai feldolgozás és a lépték növelés (scale up) tekintetében észlelhető, mely hosszú feldolgozási időt, illetve magas költségeket eredményez. A mikroorganizmusok könnyű tenyésztésből és kezeléséből kifolyólag három fő mikrobiális expressziós rendszert alkalmaznak antitestek, antitest

fragmentumok előállítására: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, továbbá *Escherichia coli* (Spadiut és *mtsai.*, 2014; Kunert és Reinhart, 2016).

A rekombináns mAb-ok kifejeződéséhez legjelentősebb emlős gazdasejtvonalak a CHO, az egér mielóma sejtek (NS0, Sp2/0), illetve a HEK293 humán sejtvonal mint expressziós rendszerek. Több száz különböző emlős sejtvonal elérhető, illetve jelentős erőfeszítéseket tesznek nagy termelékenységű sejtvonalak következő generációjának kifejlesztésére, ennek ellenére a két legmegbízhatóbb sejtvonal továbbra is a CHO és HEK293. A HEK293 sejtvonal kifejlesztése humán embrionális vesesejtek adenovírus töredékével történő transzformálás során valósult meg, eredményeképpen egy olyan sejtvonal jött létre, amely gyorsan szaporodik és könnyen transzfektálható. Széles körben alkalmazzák főként kutatási célú fehérjék előállítására, ugyanakkor a közelmúltban öt HEK293 sejtekben előállított terápiás készítmény engedélyezett az FDA és az EMA, mindemellett ezen termékek száma folyamatosan növekedik. A CHO sejtvonalat kínai hörcsög petefészkek biopsziájából tenyésztették, a legtöbb terápiás célra használt rekombináns fehérjét ebben az emlős gazdaszervezetben termeltetik, ugyanis képesek magas termelékenységre, alkalmazkodnak kémiaiilag meghatározott közegekhez, illetve jellemzően nem hoznak létre ártalmas termék változatokat. Mindkét sejtvonal fenntartható adhézios, vagy szuszpenziós tenyészetekben, habár a szuszpenziós tenyészetek kedveltebbek a lépték növelés, illetve a könnyű kezelhetőség miatt. Ezen szuszpenziós sejteket sikeresen használják bioreaktorokban, amelyek rendelkezésre állnak 10 mL-től több ezer literig is, ugyanakkor magas fokú sterilitást és karbantartást igényelnek. Az Ipilimumab immunterápiás mAb előállítása is főként CHO sejtvonalban történik, kereskedelmi megnevezése Yervoy (Dumont és *mtsai.*, 2016; Kunert és Reinhart, 2016; Hunter és *mtsai.*, 2019; Pulix és *mtsai.*, 2021).

A mAb-ok előállításához további kritikus fontosságú komponensek az expressziós vektorok, más néven expressziós konstrukciók, mivel ezek olyan hordozóeszközök, amelyek segítségével a kívánt fehérjét kódoló gén a célsejtbe, vagyis a gazdaszervezetbe juttatható. Ezen vektoroknak tartalmazniuk kell azokat az alapvető elemeket, amelyekkel a sejt felismeri a DNS-t, illetve indukálja a transzkripciót és translációt a kívánt fehérje kifejeződése érdekében. Ilyen elemek közé tartozik a promóter, a poli- vagy multiklónozó hely, transzkripció terminációs szekvencia (3'UTR) amely egy poliadenilációs szignál (polyA) szekvenciát tartalmaz, illetve egyéb elemek közé tartoznak az enhancerek, intronok, szelekciós markerek és a replikációs origók is. A fehérje kifejeződése történhet tranziens (átmeneti) és stabil módon, mindkét módszer a cél DNS sejtekbe juttatását igényli. A tranziens expresszió során a vektor soha nem integrálódik a sejt genomjába, ebből kifolyólag a projekt korai szakaszában ezt a módszert

részesítik előnyben mivel a fehérjét gyorsan és alacsonyabb költségekkel képes kifejezni. Ezzel szemben a stabil expressziót magas hozam elérése érdekében alkalmazzák (Bandaranayake és Almo, 2014; Hunter és *mtsai.*, 2019).

Az előállítani kívánt fehérje génjét hordozó expressziós vektorok transzfekciójához számos módszer áll rendelkezésre mely kiválasztása függ a gazdasejt típusától, illetve a fehérje termelés mennyiségétől. Főként kémiai, fizikai és vírus általi transzfekciós módszereket különböztethetünk meg. A kémiai módszerek során a DNS bejuttatása vegyi anyag segítségével történik, ezek közül széles körben CaCl_2 -ot vagy a DEAE-dextránt használták, mivel gazdaságos, azonban alacsony transzfekciós hatékonysággal bír, toxikus lehet a sejtekre nézve és nem mindegyik alkalmas stabil sejtvonal létrehozására. Ebből kifolyólag a kationos lipidek (mint például Lipofectamine, FreeStyle Max Reagent) nagyobb népszerűségnek örvendenek, növelt hatékonyságának, valamint számos sejt típus transzfektálásra való alkalmazhatóságuk miatt. A fizikai transzfekciós módszerek közé az elektroporáció, a közvetlen injekció és a lézer alapú transzfekció sorolható, azonban kevesebb mennyiségek esetén hatékonyak, illetve költséges berendezéseket igényelnek. Harmadik módszer típus a vírus vektorrendszerek használata által valósul meg, habár kockázatossága miatt nem engedélyezett klinikumban alkalmazott rekombináns fehérjék előállítására (Dumont és *mtsai.*, 2016; Hunter és *mtsai.*, 2019).

1.7. Monoklonális antitestek piaca

Monoklonális antitestek alkalmazása terén az áttörés 2011-ben vette kezdetét amikor az FDA elsőként engedélyezte az Ipilimumab (*lásd 1. táblázat*), immun ellenőrzőpont-gátló kezelések alkalmazását áttétképző melanoma esetében. Alig egy évtized alatt a mAb-ok és ehhez kapcsolódó terápiás szerek folyamatosan növekedtek, míg a biogyógyszerészeti piacon domináns terméké nem váltak. 2018-ban a monoklonális antitestek összesített piaci értéke 107,7 milliárd euró, figyelembe véve a növekvő ütemet 2025-re elérheti a 280 milliárd eurót. 2020 augusztusáig mért adatok szerint az Egyesült Államokban és Európában 97 terápiás mAb készítményt engedélyezett az EMA, illetve az FDA, emellett számtalan fejlesztésben lévő monoklonális antitest található meg (Esfahani és *mtsai.*, 2020; Carrara és *mtsai.*, 2021).

2. Célkritizálás

Az eddig kifejlesztett immunterápiában alkalmazott készítmények többségét CHO és egér mielóma sejtvonalak felhasználásával állítják elő, ugyanakkor a megfelelő poszttranszlációs módosítások jelenléte miatt a kutatások a humán sejtvonalban történő előállítás fele összpontosulnak. Mivelhogy az emlős sejtekben történő expresszióra még nem áll rendelkezésre univerzális stratégia, a kutatók gyakran küzdenek a megfelelő eljárás kifejlesztésével a számtalan rendelkezésre álló módszer, illetve eszköz használatával.

Jelen kutatás célja az Ipilimumab rekombináns fehérje, mint immunterápiában alkalmazott monoklonális antitest előállítása tranziens expresszióval HEK293 humán sejtvonalban.

A transzfekcióhoz szükséges Ipilimumab könnyű és nehéz lánc génjét tartalmazó vektor konstrukciók (pOptiVec/pcDNA3.3 Ipilimumab LC/HC) ellenőrzése: a megfelelő klónok kiválasztására alkalmazott kolónia PCR, agaróz gélelektroforézis, plazmid izolálás, illetve restrikciós endonukleáz emésztéssel.

A megfelelő konstrukciók kiválasztását követi az idegen DNS befogadására (kotranszfekcióra), valamint a rekombináns fehérje kifejeződését megvalósító gazdaszervezet, a HEK293 humán sejtvonal előkészítése, melynek célja az optimális sejtszám elérése a megfelelő tápoldat és tenyésztési körülmények biztosításával. Ezen folyamattal párhuzamosan célunk olyan vektor mixeket előkészíteni, amely során vizsgálható, hogy a két vektorban külön-külön klónozott könnyű/nehéz lánc gének mely kombinációja eredményez magasabb hozamot. A termelődött antitest kimutatását SDS-PAGE (Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis) módszerrel mutatjuk ki.

A kutatás fő célja közé tartozik az Ipilimumab immun ellenőrzőpont gátló terápiás rekombináns fehérje termelésének optimalizálása humán sejtvonalban. A rekombináns DNS konstrukciók előállítása az ANTICORP (POC/161/6/3) projekt keretében valósult meg. Jelen kutatási munka nem képezi tárgyát a projektben foglalt munkafolyamatoknak, mint egy alternatívát vizsgál eltérő emlős gazdasejtben való előállításra.

3. Anyagok és módszerek

A rekombináns konstrukciók ellenőrzésétől és *in silico* tervezésétől, a gazdaszervezet transzfektálásától a termelődött fehérje kimutatásáig a felhasznált anyagokat, továbbá az alkalmazott módszereket ezen fejezetben ismertetjük részletesen. A teljes kutatási munkafolyamatot a 3. ábra szemlélteti.

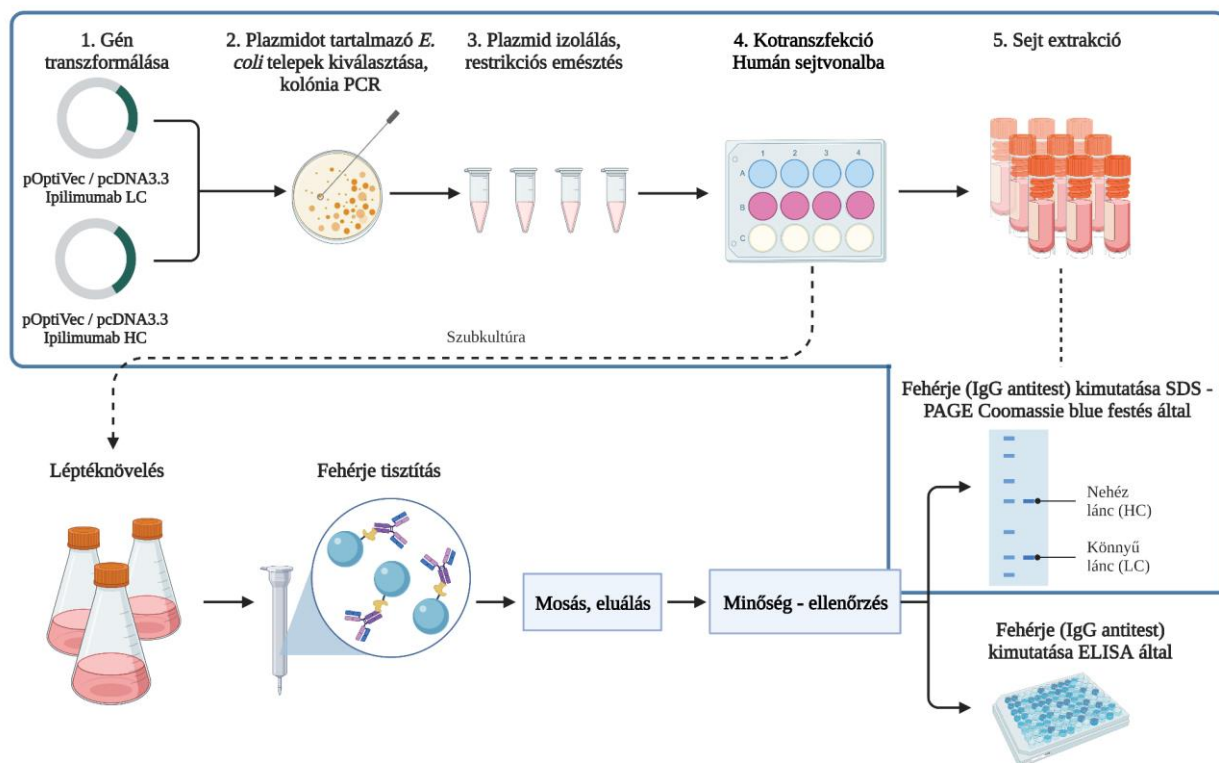
A kutatás első fázisában a monoklonális antitest (Ipilimumab) humán sejtvonalban történő termeléshez kiválasztottunk két expressziós rendszert, a pOptiVec illetve a pcDNA3.3 vektorokat, melyekbe a monoklonális antitest két különböző polipeptidláncát, a könnyű (LC – Light chain) és a nehéz lánc (HC – Heavy chain) régió bejuttatható. Az expressziós rendszerek transzformációja *E. coli* gazdasejtbe történt mindkét vektor esetében. Ezen kultúrák közül a megfelelőket kolónia PCR alkalmazásával választottuk ki, melyeket izoláltuk. A plazmid izolálás sikerességét pOptiVec vektor esetében NcoI, pcDNA3.3 vektor vonatkozásában pedig AgeI, AgeI+NdeI restrikciós emésztésekkel állapítottuk meg.

A monoklonális antitestek génjét tartalmazó DNS konstrukció befogadására és annak expressziójára képes gazdasejtet, a HEK293 humán sejteket előneveltük megfelelő médium használatával (DMEM, 1% Penicillin-Streptomycin komplex, 10% FBS, 2 mM Glutamin), optimális tenyésztési körülmények között (37°C 5% CO₂ inkubátor). A sejtek növekedését inverz mikroszkóp alatt követtük nyomon, továbbá a gazda sejtekkel történő minden műveletet magas fokú sterilitás betartásával, II. típusú biztonsági lamináris fülke (Herasafe, ThermoFisher Scientific) alatt, steril eszközökkel végeztünk.

A kutatás során a két konstrukció párból 4 eltérő LC-HC régiókkal történő kombinációt (DNS mixet) vizsgáltunk, amelyeket különböző mennyiségekben juttattunk a sejtekre. A transzfekció kivitelezéséhez mixenként 6-6 µg DNS mennyiségre volt szükségünk, a DNS koncentráció meghatározása Qubit készülék (Qubit Fluorometer, Life Technologies) segítségével valósult meg. Mind a 4 kombináció esetén két-két különböző koncentráció mellé egy kontroll csoportot társítottunk. A transzfekció időtartama 6 nap volt, amely alatt 37°C 5% CO₂ tartalmú inkubátorban tároltuk a sejteket. Az inkubációs idő lejártá után a vizsgált körülményenként leszedtük a felülszót, utána PBS oldattal mostuk, (1x) Tripszin-EDTA oldat használatával a lemez felületére letapadt sejteket felvettük. Centrifuga csövekbe begyűjtöttük egyenként a sejt kultúrákat és centrifugáltuk 5 percig 120 g-n. A pelletet felfuszpendáltuk 150

μL A pufferben (20 mM MOPS; 100 mM NaCl) és felhasználásig kriotubusban -80°C -on tároltuk.

Az expresszált monoklonális antitest kimutatását SDS-PAGE eljárás segítségével végeztük. A minta előkészítését SDS mintakezelő festékekkel, 5 perc 98°C -on lévő főzéssel és 5 perc 18000 rpm-en történő centrifugálással valósítottuk meg. A termelődött monoklonális antitest régiók 23,45 kDa (LC – könnyű lánc), illetve 49,25 kDa (HC – nehéz lánc) nagyságban várhatóak.



3. ábra: Ipilimumab monoklonális antitest előállítása emlős sejtvonalban, jelen kutatási munkát a bekeretezett lépések szemléltetik (Biorender.com segítségével szerkesztve)

3.1. Felhasznált anyagok, alkalmazott eszközök és berendezések

Az Ipilimumab expressziójának vizsgálatához 4 rendelkezésünkre bocsájtott konstrukciót (ligálási terméket) kellett ellenőriznünk. Az Ipilimumab LC és HC régiója külön-külön klónozva a pOptiVec és pcDNA3.3 vektorban, eredményezte a következő konstrukciókat:

- pOptiVec-IpiliLC
- pOptiVec-IpiliHC
- pcDNA3.3-IpiliLC
- pcDNA3.3-IpiliHC

Ezen konstrukciók kimutatása kolónia PCR-rel történt, a 2. táblázatban feltüntetett primerek segítségével.

2. táblázat: Ipilimumab expressziója során használt primerek és tulajdonságaik (bp - bázispár)

Primer (10 µM)	Szekvencia	Amplikon pOptiVec	Amplikon pcDNA3.3
Np Ipili LC fw	GGCCGCCATGAAGTGGGTGA	708 bp	709 bp
Cp Ipili LC rev	TCAACACTCGCCTCTATTGAAGGAC		
Np Ipili HC fw	GGCCGCCATGACTCGACTAAC	1410 bp	1411 bp
Cp Ipili HC rev	TCACTTGCCAGGGGACAAAG		

A kolónia PCR végrehajtásához szükséges komponensek: Taq polimeráz, (10x) Taq Puffer (NH₄)₂SO₄-al, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mix (ThermoFisher Scientific); továbbá ultratiszta víz (up H₂O).

A PCR termékek, konstrukciók ellenőrzése gélelektroforézissel: Agaróz (Sigma); 1x TAE (Tris-acetát-EDTA: 0,4 M Tris acetát, Sigma; 0,01 M EDTA, Merck) puffer; GeneRuler 1 kb plus molekulasúly létra (ThermoFisher Scientific), 6x LD (Loading Dye, ThermoFisher Scientific) felvivő festék; RedSafe (LiliF Diagnostic Products; 20000x), detektáláshoz szükséges DNS kötő fluoreszcens festék.

Az Ipilimumab LC és HC régiók izolálásához, illetve ellenőrzéséhez szükséges plazmid izoláló kit, és restrikciós nukleáz enzimek: Plazmid izoláló kit, ZR Plasmid Miniprep - Classic kit (Zymo Research); NcoI, AgeI, NdeI, SmaI (10 U/μL), (10x) Tango puffer, (10x) Orange puffer (ThermoFisher Scientific); SmaI (10 U/μL), (10x) rCutSmart puffer (BioLabs)

További eszközök és berendezések: 1000 μL, 200 μL és 10 μL mikropipetták, steril pipetta hegyek; 1,5 mL centrifuga tubusok; PCR mikrocentrifuga tubusok; 50 mL centrifuga tubusok; Steril Ampicilines tápagar, Petri-csészék; Lamináris elszívófülke (Vertical 700 laminar flow, Asalair); Centrifuga (Mikro 22R, Hettich; Z 200A, Hermle); Vortex kavarázó (Wizard, Star Lab); Rázó inkubátor 37°C (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan); Inkubátor 98°C (Thermo Shaker TS-100, Biosan); Thermocycler PCR készülék (Swift MiniPro, Esco); Gélelektroforézis készülék (PowerPac Basic, Bio-Rad); pH mérő (Orion Star A111, ThermoFisher Scientific); UV - transzilluminátor (TFX-20.MC, Biotech)

Az Ipilimumab monoklonális antitest könnyű és nehéz láncának génjét hordozó vektorok befogadására képes HEK293 humán sejtvonal a Pécsi Tudományegyetem ajándéka.

A transzfekcióhoz szükséges oldatokat steril körülmények között szűrtük (0,22 μm):

1. 50 mL A puffer (20 mM MOPS; 100 mM NaCl)
2. 50 mL (2x) HBS (HEPES Buffered Saline) puffer; pH 7,24 (281 mM NaCl; 100 mM HEPES; 1,5 mM Na₂HPO₄)
3. 50 mL CaCl₂ oldat (2,5 M CaCl₂)
4. 50 mL 0,1x TE (Tris-EDTA) puffer; (10 mM Tris pH 8; 1mM EDTA pH 8)
5. 500 mL PBS puffer; pH 7,4 (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄)

A sejtek megfelelő tenyésztési körülmények biztosításához DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza) tápoldatot alkalmaztunk, kiegészítve 2 mM L-Glutaminnal (Gibco), 10% FBS-el (Fetal Bovine Serum, Gibco) és 1% Penicillin-Streptomycin oldattal (100 U/mL; Sigma). A passzálás során (1x) Tripszin-EDTA (Gibco) oldatot alkalmaztunk, míg a sejtek fagyasztását 5 %-os DMSO (Dimetil - szulfoxid; Sigma) tartalmú tápoldatban végeztük.

Az Ipilimumab transzfekciójához szükséges eszközök és berendezések:

- Steril szűrő (0,22 μm méretű), steril fecskendők; 10 mL steril szerológiai pipetta; 15 mL, 50 mL steril centrifuga tubusok; PCR mikrocentrifuga tubusok; T75 flaska (EasYFlask, ThermoFisher Scientific); Pipetusz (Hirschmann Laborgerate); II. típusú

biztonsági elszívófülke (Herasafe, Thermo Scientific); 5% CO₂ tartalmú 37°C inkubátor (Innova CO-14, New Brunswick Scientific); Inverz mikroszkóp (XDS-3, Optika Microscopes Italy); Qubit DNS koncentráció mérő készülék (Qubit Fluorometer, Life Technologies); Centrifuga; 12 lyukú (Well) steril sejttenyésztő mikroplate (ThermoFisher Scientific); Hemocitóméter - Bürker kamra (Hirschmann Techcolor); Mikroplate rázató (Titramax 100, Heidolph); -80°C hűtőszekrény (Ultra-Low Temperature Freezer, Sanyo)

Kotranszfekció sikerességét ellenőrző SDS-PAGE (Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium-dodecyl-sulphate) poliakrilamid gélelektroforézis) módszerhez szükséges reagensek: Ultratiszta víz (up H₂O); 40% AA (Akrilamid; Bio-Rad); 10% SDS; 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8; TEMED (Tetramethylethylenediamine; Bio-Rad); 10% APS (Ammónium perszulfát); Izopropanol; Red Loading Buffer felvivő festék (BioLabs); PageRuler Prestained Protein Ladder, molekulasúly létra (ThermoFisher Scientific); Mintakezelő festék (SDS sample buffer: Red Loading Buffer Pack, BioLabs); DTT (PanReac AppliChem); 2-Mercaptoethanol (Sigma), Coomassie blue (Bio-Rad); festéktelenítő oldat (Destain; 10% ecetsav, 50% metanol, 40% H₂O).

3.2. Az Ipilimumab mAb génjét tartalmazó vektor konstrukciók ellenőrzése

3.2.1. Ipilimumab pOptiVec expressziós vektor

A konstrukciók ellenőrzéséhez elsőként kolónia PCR-t használtunk a 3. táblázatban lévő reakció összetevők segítségével. A kolónia PCR során baktérium telepeket használtunk templátként (12-12 telepet), célja azon baktérium kolóniák kiválasztása melyek tartalmazzák a megfelelő klónt, tehát az Ipilimumab könnyű és nehéz lánc géneket hordozó expressziós vektorokat. Elvégzése során a templát hozzáadása lamináris elszívófülke alatt, steril körülmények között történt.

3. táblázat: Kolónia PCR reakcióhoz szükséges összetevők

Komponensek	Mennyiség/PCR tubus
10x PCR puffer	5 µL
25 mM MgCl ₂	4 µL
10 mM dNTP mix	2 µL
10 µM primer Forward	2 µL
10 µM primer Reverse	2 µL
Taq polimeráz	0,3 µL
up H ₂ O	33,7 µL
Templát/reakció	1 µL
Kimért mennyiség/PCR tubus	50 µL

A kutatás folyamán alkalmazott PCR program:

Ciklus:	<u>94°C</u>	<u>5 min</u>	<u>Denaturáció</u>
	94°C	15 sec	Denaturáció
35x	53°C	30 sec	Anellálás
	<u>72°C</u>	<u>1 min 20 sec</u>	<u>Extenzió</u>
	72°C	7 min	Végző extenzió
	4°C	∞	

A kolónia PCR reakciót, illetve termékek képződését, méretét gélelektroforézis módszerrel ellenőriztük. Végrehajtása általános agaróz gélelektroforézis protokoll alapján történt:

- 1%-os agaróz gél, puffer: 1xTAE; 2 x 1 perc mikrohullámú sütőben lévő forralás.
- Az agaróz oldatba 4 µL (100 mL-hez 5 µL) RedSafe fluoreszcens festéket mértünk.
- Parafilmen 1 µL felvivő festékkel, vagyis 6x-os LD-al (Loading Dye) összekevert mintákból 5 µL-t vittünk fel a gélre.
- **Marker:** 2 µl molekulasúly létra (GeneRuler 1 kb plus).
- **Futtatás:** 30 perc 90 V konstans feszültséggel.
- **Vizualizáció:** UV transzilluminátorban láthatóvá válik a DNS.

A 12-12 telep közül kiválassztottuk a három tisztább amplikont eredményező PCR terméket pOptiVec-IpiliLC és pOptiVec-IpiliHC esetén is, melyeket újból ellenőriztünk a plazmid izolálás előkészítéséhez. A pOptiVec Ipili LC/HC izolálása ZR Plasmid Miniprep-Classik kit használatával történt.

A megfelelő restrikciós enzimek kiválasztásához SnapGene programot alkalmaztunk, a pOptiVec-IpiliLC emésztése NcoI restrikciós enzimmel történt, 4. táblázatban látható a képződött amplikonok mérete.

- pOptiVec-IpiliLC teljes hossz: 5111 bp; Ipilimumab LC: 750 bp → 1469 bp = 720 bp

4. táblázat: Restrikciós enzimek hasítási helyei pOptiVec-IpiliLC és a konstrukció nélküli, kontroll vonatkozásában (pOptiVec-Mock)

Enzimek	pOptiVec-IpiliLC	pOptiVec-Mock
NcoI	414 bp → 2079 bp (1665 bp ampikon)	414 bp → 1394 bp (980 bp ampikon)

- Az enzimhez megfelelő puffert és hőmérsékleti paramétereket választottuk: 2 µL 10x Tango puffer; 5 µL plazmid; 1 µL enzim (NcoI); 12 µL upH₂O.
 - 37°C-on 1 óra inkubálás; 65°C-on 20 perc inaktiválás (Thermo Shaker készülékben).

Ellenőrzés gélelektroforézissel, az eddigi protokoll alapján történt, kivétel, hogy a teljes mennyiségű emésztési terméket (20 µL) felvittük a gélre 4 µL LD használatával.

A pOptiVec-IpiliHC emésztése NcoI restrikciós enzimmel történt, 5. táblázatban látható a képződött amplikonok mérete.

- pOptiVec-IpiliHC teljes hossz: 5813 bp; Ipilimumab HC: 750 bp → 2171 bp = 1422 bp
- pOptiVec-Mock hossz: 4426 bp

5. táblázat: Restrikciós enzimek hasítási helyei pOptiVec-IpiliHC és a konstrukció nélküli, kontroll vonatkozásában (pOptiVec-Mock)

Enzimek	pOptiVec-IpiliHC	pOptiVec-Mock
NcoI	414 bp → 2781 bp (2367 bp, 3446 bp ampikon)	415 bp → 1398 bp (3446 bp, 980 bp ampikon)

- Az enzimhez megfelelő puffert és hőmérsékleti paramétereket választottuk: 2 µL 10x Tango puffer; 5 µL plazmid; 1 µl enzim (NcoI) hozzáadása; 12 µL upH₂O.
 - 37°C-on 1 óra inkubálás; 65°C-on 20 perc inaktiválás; gélelektroforézis.

3.2.2. Ipilimumab pcDNA3.3 expressziós vektor

A műveletek lépései megegyeznek a pOptiVec expressziós vektor esetén használt lépések menetével.

A pcDNA3.3-IpiliLC emésztése AgeI restriktációs enzimmel történt, a 6. táblázatban látható a képződött amplikonok mérete.

- pcDNA3.3-IpiliLC teljes hossz: 6136 bp; Ipilimumab LC: 762 bp → 1481 bp = 720 bp

6. táblázat: Restriktációs enzimek hasítási helyei pcDNA3.3-IpiliLC és a konstrukció nélküli, kontroll vonatkoztatásában

Enzimek	pcDNA3.3-IpiliLC	pcDNA3.3-Oligo
AgeI	1009 bp → 1486 bp (477 bp amplikon) 2646 bp → 997 bp (3462 bp amplikon)	5436 bp

- Az enzimhez megfelelő puffert és hőmérsékleti paramétereket választottuk: 2 µL 10x Tango puffer; 5 µL plazmid; 1 µL enzim (AgeI); 12 µL upH₂O.
 - 37°C-on 1 óra inkubálás; 65°C-on 20 perc inaktiválás; gélelektroforézis.

A pcDNA3.3-IpiliHC emésztése AgeI+NdeI restriktációs enzimekkel történt, a 7. táblázatban látható a képződött amplikonok mérete.

- pcDNA3.3-IpiliHC teljes hossz: 6838 bp; Ipilimumab HC: 762 bp → 2183 bp = 1422 bp

7. táblázat: Restriktációs enzimek hasítási helyei pcDNA3.3-IpiliHC és a konstrukció nélküli, kontroll vonatkoztatásában

Enzimek	pcDNA3.3-IpiliHC	pcDNA3.3-Oligo
AgeI+NdeI	300 bp → 2188 bp (1888 bp amplikon) 2188 bp → 300 bp (4950 bp amplikon)	300 bp → 786 bp (4950 bp, 486 bp amplikon)

- Az enzimekhez megfelelő puffert és hőmérsékleti paramétereket választottuk: 2 μL 10x Orange puffer; 5 μL plazmid; 1-1 μL enzim (AgeI+NdeI); 11 μL upH_2O .
 - 37°C-on 1 óra inkubálás; 65°C-on 20 perc inaktiválás; gélelektroforézis.

3.3. CaCl_2 alapú kotranszekció HEK293 humán sejtvonalban

3.3.1. HEK293 humán sejtvonal előkészítése a kotranszekcióhoz

- A HEK293 humán sejtvonal kioltatása -80°C-ról gyorsan történt a DMSO általi sejtek roncsolódása elkerülése végett, ezenkívül előmelegített 1,5 mL tápoldatban (DMEM médium, 10% FBS, 2 mM Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin oldat) feloldottuk, centrifugáltuk 750 rpm-en 5 percig; felülúszót leszedtük, illetve a pelletet 10 mL tápoldatban szuszpendáltuk, ezek után sejtszámlálás következett, 1×10^6 kezdeti sejtszámmal indítottunk T75-ös flakóban.
- A humán sejtvonallal történő munkákat megelőzően elkészítettük, szűrtük a sejtek kezeléséhez, illetve a transzekcióhoz szükséges puffer oldatokat (A puffer, 2x HBS; CaCl_2 oldat; 0,1x TE puffer; PBS puffer).
- A HEK293 sejteket munkafolyamatokon kívül 37°C-os 5% CO_2 inkubátorban tároltuk a megfelelő növekedés érdekében.
- Inverz mikroszkóp alatt nyomon követtük a növekedést, 90-100% konfluencia szint elérése után passzáltuk 12 lyukú steril sejttenyésztő lemezre, fontos, hogy minden sejtekkel történő műveletet magas fokú sterilitással, II. típusú biztonsági elszívófülke alatt, illetve csak steril eszközök használatával szükségszerű végezni.
 - Az átoltás során óvatosan eltávolítottuk az elhasznált médiumot, illetve a maradék tápoldat eltávolítása érdekében kétszer mosást végeztünk a sejteken PBS mosó pufferrel (Foszfát puffer: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4). A letapadt sejtekre 2 mL előmelegített (1x) Tripszin-EDTA reagenst adtunk hozzá, mely hatására a fehérjék felszakadnak a felületről, a kezelés 5 percig és 37°C-on zajlik.
 - Pipettával leszívtuk és inaktiváltuk a Tripszint 10 mL előmelegített médium hozzáadásával, a begyűjtött sejteket egy - egy 15 mL-es mikrocentrifuga tubusba helyeztük, melyet 5-6 percig 125 g-n (1500 rpm) centrifugáltunk.

- A felülúszó leszívása után a sejteket 24-24 mL médiummal szuszpendáltuk, illetve szétosztottuk két darab (második lemez sejt elrakásra szolgál) 12 lyukú lemezre 2 mL/lyuk (well)-ként, 20 μ L szükséges sejt számláláshoz. A lyukankénti felület: $3,5 \text{ cm}^2 \rightarrow 70\text{--}175000$ sejtre lehet számítani / lyuk.

Hemocitóméter segítségével meghatároztuk a kezdeti sejtszámot. A következő 1. és 2. napon nyomon követtük a sejtek növekedését, illetve letapadásukat a lemez felületére, mindaddig amíg el nem érték a transzfekcióhoz szükséges 90%-os konfluencia szintet. Minden nap eltávolítottuk az elhasznált táp oldatot és újabb 2 mL 37°C-ra előmelegített médiumot lassan, csepegtetve pipettáztuk a letapadt sejtekre.

3.3.2. Ipilimumab LC és HC régiót tartalmazó DNS mixek kotranszfekciója HEK293 sejtvonalba

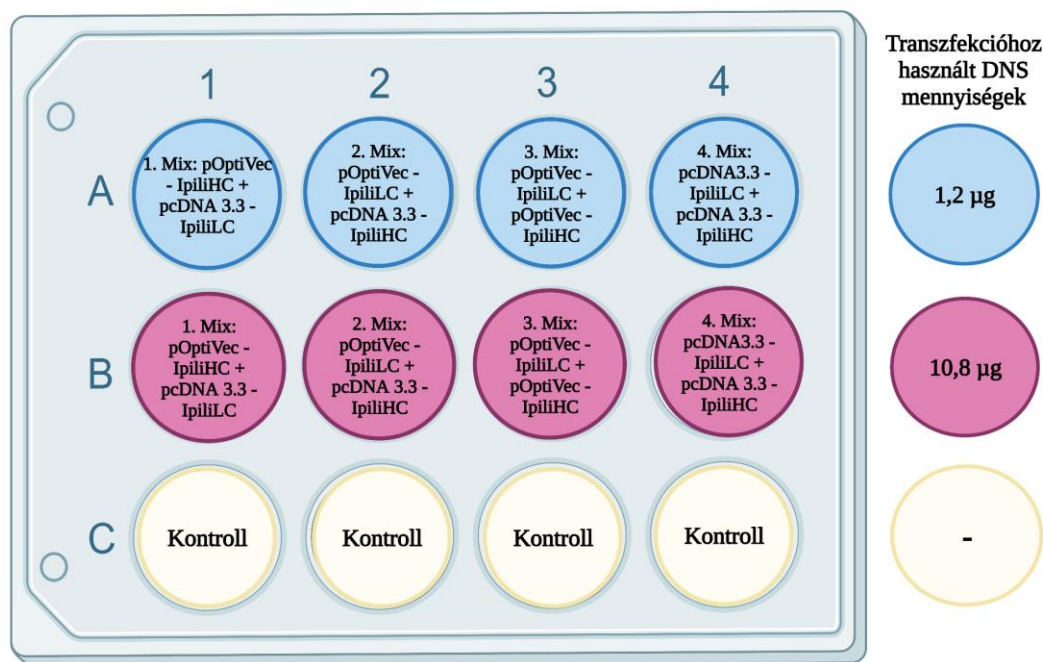
A transzfekció előtt 2 órával óvatosan eltávolítottuk a sejteken lévő 2 mL médiumot, és újabb 1 mL előmelegített médiumot adtunk hozzá. A kísérlet során a két konstrukció párból 4 eltérő kombinációt, DNS mixet vizsgáltunk, amelyeket különböző mennyiségekben juttattunk a sejtekre, minden variációhoz saját kontrollt párosítva. A transzfekció kivitelezéséhez mixenként 6-6 μ g DNS mennyiségre van szükség, a plazmidok DNS koncentrációját Qubit készülék segítségével határoztuk meg. A 6 μ g transzfektálni kívánt DNS mennyiség elérését a 8. táblázatban lévő hígítások alapján értük el, melyet fülke alatt steril 1,5 mL-es mikrocentrifuga tubusokba hígítottunk 0,1x-es TE pufferrel, mixenként 450 μ L térfogatig.

8. táblázat: Kotranszfekció során alkalmazott DNS mixek összetétele

DNS mix	0,1x TE*	pOptiVec-IpiliLC	pOptiVec-IpiliHC	pcDNA3.3-IpiliLC	pcDNA3.3-IpiliHC
		DNS koncentráció [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]			
		Bemért térfogat (6 μg DNS) [μL]			
1	431 μL	-	0,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	-
		-	14,35 μL	4,62 μL	-
2	429 μL	0,53 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	-	-	0,64 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
		11,49 μL	-	-	9,49 μL
3	424, 2 μL	0,53 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	-	-
		11,49 μL	14,35 μL	-	-
4	435, 9 μL	-	-	1,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,64 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
		-	-	4,62 μL	9,49 μL

*Hígításhoz szükséges 0,1x TE puffer mennyiség

A hígított mixekhez egyenként 50 μL 2,5 M CaCl_2 oldatot használtunk, szobahőmérsékleten 5 percig állni hagytuk. Tubusonként 500 μL 2x HBS puffert pipettáztunk a pH ideális szinten tartása érdekében, adagolása 50 μL -ként alapos vortexeléssel történt. A tápcsere után 2 óra elteltével a mikropate lyukakba adagoltuk a DNS kombinációkat, a 4. ábra szerint, a mixekből az A sorba 100 μL (1,2 μg DNS), a B sorba 900 μL (10,8 μg DNS) mennyiségeket, a C sorba pedig nem alkalmaztunk transzfekciós mixet.



4. ábra: Transzfekció kezdete a 12 lyukú steril sejtenyésztő lemezen, 4 különböző kombinációt alkalmaztunk változó mennyiséggel, illetve referenciával ellátva (Biorender.com segítségével szerkesztve)

- Transzfekció időtartama 6 nap, ezalatt 37°C 5% CO₂ inkubátorban tároltuk a sejteket¹.

3.3.3. HEK293 sejtek összegyűjtése

- A transzfekciós idő lejártá után lyukanként leszedtük a felülúszót, amelyet 2 mL-es kriotubusban tároltuk felhasználásig -80°C-on, lyukanként a sejtek mosása PBS oldattal történt.
- Lyukanként kezeltük 150 µL (1x) Tripszin-EDTA-val, 2-3 percig 37°C-on, miután a letapadt sejtek feljöttek inaktiváltuk a tripszint 1,5 mL médiummal.
- 1,5 mL tubusokba begyűjtöttük egyenként a sejteket és centrifugáltuk 5 percig 3000 rpm-en; a pelletet feloldottuk 150 µL A pufferben, továbbá kriotubusban, -80°C-on tároltuk a fehérje kimutatás elvégzéséig.

¹ Calcium phosphate-mediated transfection into HEK 293T cells, <https://bio-protocol.org/>, letöltés dátuma: 2022.11.18

3.3.4. Ipilimumab kotranszfekció, expresszió sikerességének kimutatása SDS-PAGE módszerrel

SDS-PAGE módszer:

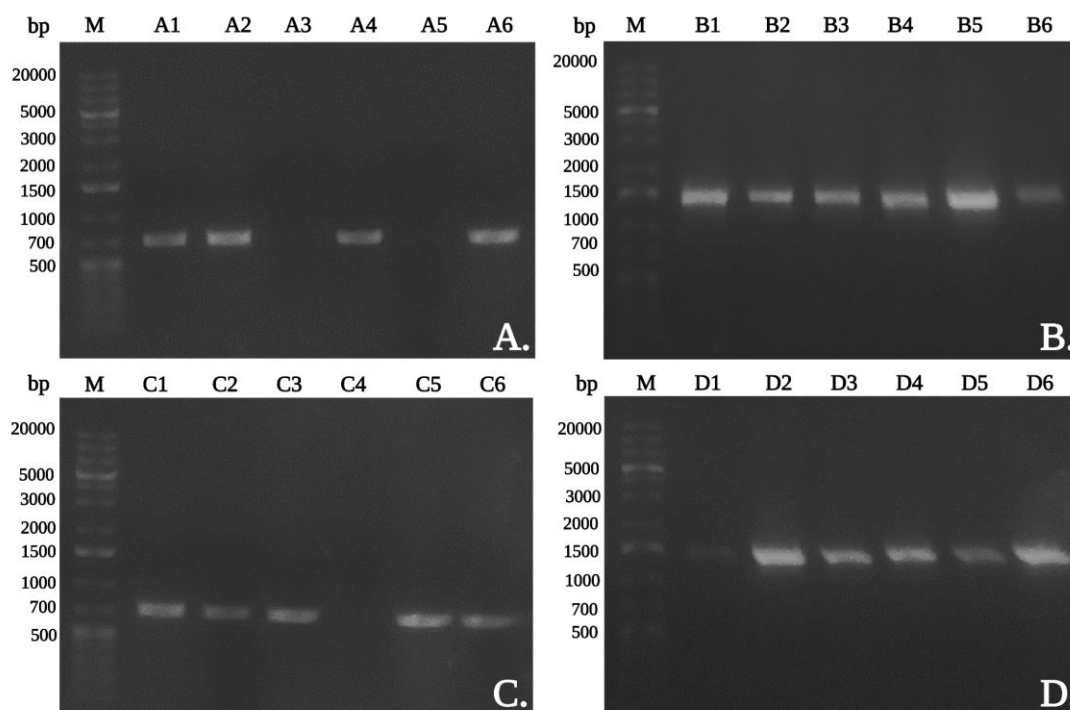
1. Alsó gél (10%-os Szeparáló gél): 4,9 mL H₂O; 2,5 mL 40 %-os Akrilamid; 2,5 mL 1,5 M pH 8,8 Tris-HCl; 10% SDS; 3 x 50 µL 10%-os APS (Ammonium persulfate); 20 µL TEMED (Tetramethylethylenediamine), Izopropanolt vittünk fel a gél kiszáradás megelőzésére, amelyet a polimerizáció után eltávolítottuk.
2. Felső gél (4%-os Koncentráló gél): 6,1 mL H₂O; 1,3 mL 40 %-os Akrilamid; 2,5 mL 0,5 M pH 6,8 Tris-HCl; 10% SDS; 3 x 50 µL 10%-os APS; 20 µL TEMED.
3. Mintaelőkészítés:
 - Reakció közegeként 50 µL A puffer-t adunk; 50 µL 2x SDS (Sample Buffer) mintakezelő festékekkel szuszpendáljuk (hígítás 2x, 5x-re); rázatás; lyukanként begyűjtöttük, 5 percig 98°C-on inkubáltuk, centrifugálás 5 perc 18000 rpm.
4. Futtatás a gélen:
 - 5 µL molekulasúly létra; 5 µL minta/zseb; 90 V 30 perc amíg elérte az alsó gél, 120 V-on 1 óra.
5. Gél előhívás:
 - 30 perc Coomassie blue festés, 30 perc festéktelenítő oldat alkalmazása, 800 rpm-en történő folyamatos rázatás segítségével történt.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1. Az Ipilimumab mAb génjét tartalmazó vektor konstrukciók ellenőrzése

4.1.1. pOptiVec Ipilimumab LC és HC expressziós vektor

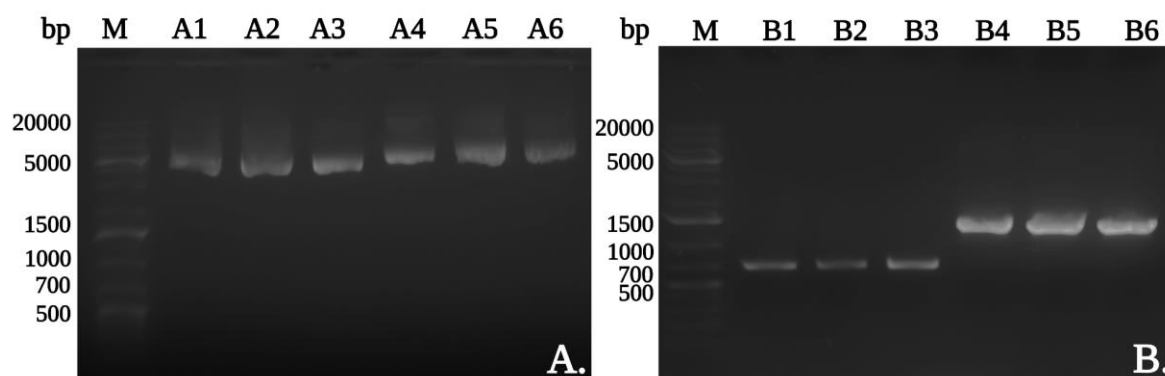
A kotranszfekcióhoz szükséges konstrukciók ellenőrzése az 5. ábrán bemutatott kolónia PCR termékek kiválasztása alapján történt, amely során a 12 Ipilimumab LC és 12 Ipilimumab HC gént tartalmazó telep közül kiválasztottunk 3-3 tiszta szegmenst eredményező *E. coli* baktérium telepet. Az 5.A és 5.C ábrán 700 bp nagyságban látható a pOptiVec-IpiliLC vektor 720 bp méretű könnyű lánc régiója, illetve az 5.B és 5.D ábrán 1500 bp-nál a pOptiVec-IpiliHC vektor 1422 bp méretű nehéz lánc régiója. A megfelelő pOptiVec-IpiliLC telepek az A6, C5, C6, illetve a B1, B5, D2 pOptiVec-IpiliHC telepek.



5. ábra: Kolónia PCR során amplifikált, Ipilimumab LC és Ipilimumab HC gént tartalmazó pOptiVec vektorral transzformált *E. coli* telepek ellenőrzése AGE-vel

(M: Molekulasúly létra (GeneRuler 1 kb Plus); **A.:** A1-A6. Ipili LC; **B.:** B1-B6. Ipili HC; **C.:** C1-C6. Ipili LC; **D.:** D1-D6. Ipili HC)

A telepek kiválasztását követően plazmid izolálást végeztünk, mely eredményét a 6. ábra szemlélteti. A 6.A ábrán a telepek plazmid (teljes vektorok) izolálásnak eredménye látható, mellette a 6.B ábrán ellenőrzésként ugyanazon minták PCR termékei, ahol elkülönülnek A1-3.-ig a könnyű és A4-A6.-ig a nehéz lánc régiók. A teljes pOptiVec-IpiliLC vektor 5111 bp (A1-A3), melyből 720 bp (B1-B3) az Ipilimumab LC, míg pOptiVec-IpiliHC vektor esetében a teljes méret 5813 bp (A4-A6) melyből 1422 bp (B4-B6) az Ipilimumab HC régió.

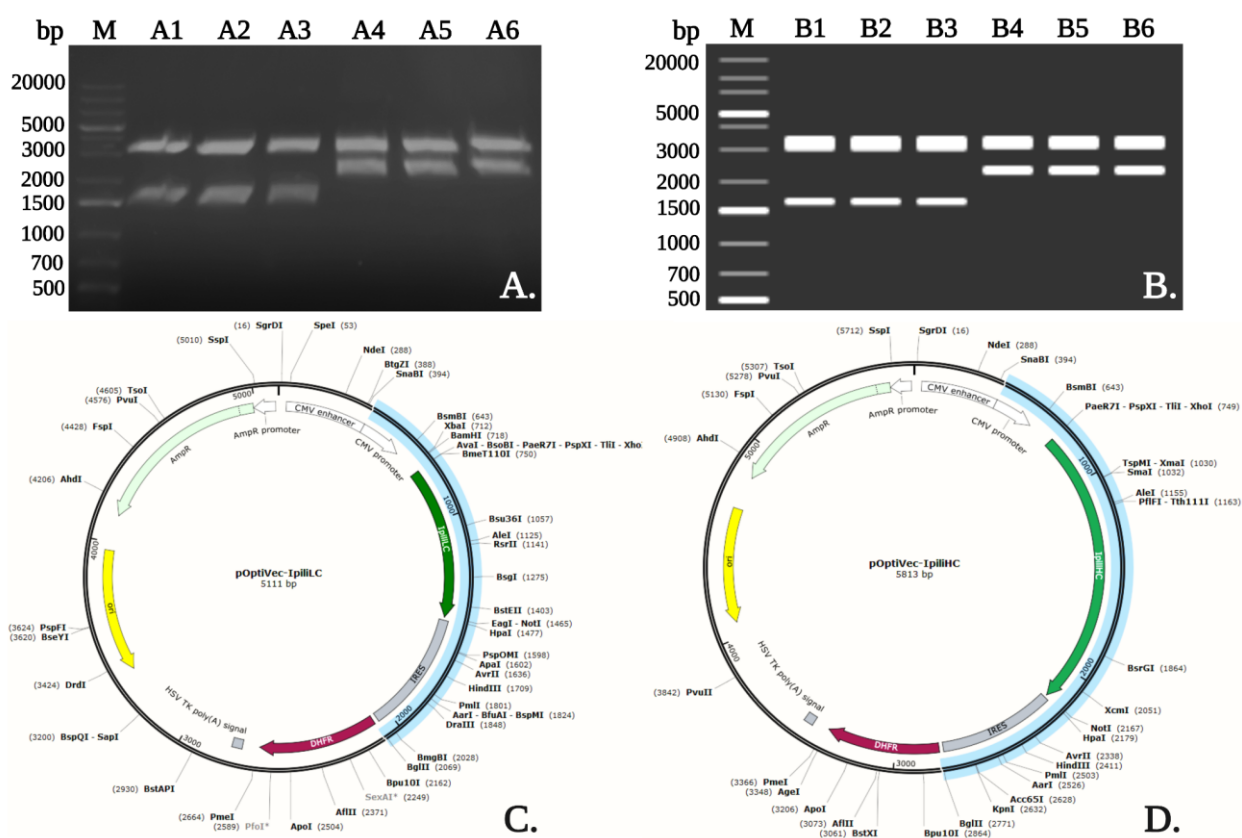


6. ábra: pOptiVec-IpiliLC és pOptiVec-IpiliHC vektor izolálás sikerességének ellenőrzése AGE módszerrel, referenciaként az adott minták PCR termékei
(M: Molekulasúly létra (GeneRuler 1 kb Plus); **A.**: Izolált vektorok, A1-A3. pOptiVec-IpiliLC, A4-A6. pOptiVec-IpiliHC; **B.**: PCR termékek, B1-B3. Ipili LC; B4-B6. Ipili HC)

A 7. ábrán látható a restriktációs endonukleáz emésztések *in silico* és a kísérleti eredmények összehasonlítása mindkét vektor konstrukció esetében. A 7.A és 7.B ábrán A1-A3, B1-B3 pOptiVec-IpiliLC konstrukciók NcoI restriktációs enzim emésztés során azonos, 1665 bp és 3446 bp nagyságú amplikont eredményeztek minden minta esetén.

A pOptiVec-IpiliHC konstrukciók A4-A6, B4-B6 minták esetében NcoI restriktációs emésztés által 2367 bp és 3446 bp méretű szegmenseket hasítottak mindegyik minta esetén *in silico* és *in vitro* kivitelezésben is.

A 7.C és 7.D ábra a teljes, pOptiVec-IpiliLC, illetve pOptiVec-IpiliHC vektor térképeken az NcoI általi hasított szegmenseket jelöli, melyen látható, hogy az adott amplikon tartalmazza a kívánt Ipilimumab (LC/HC) régiót.

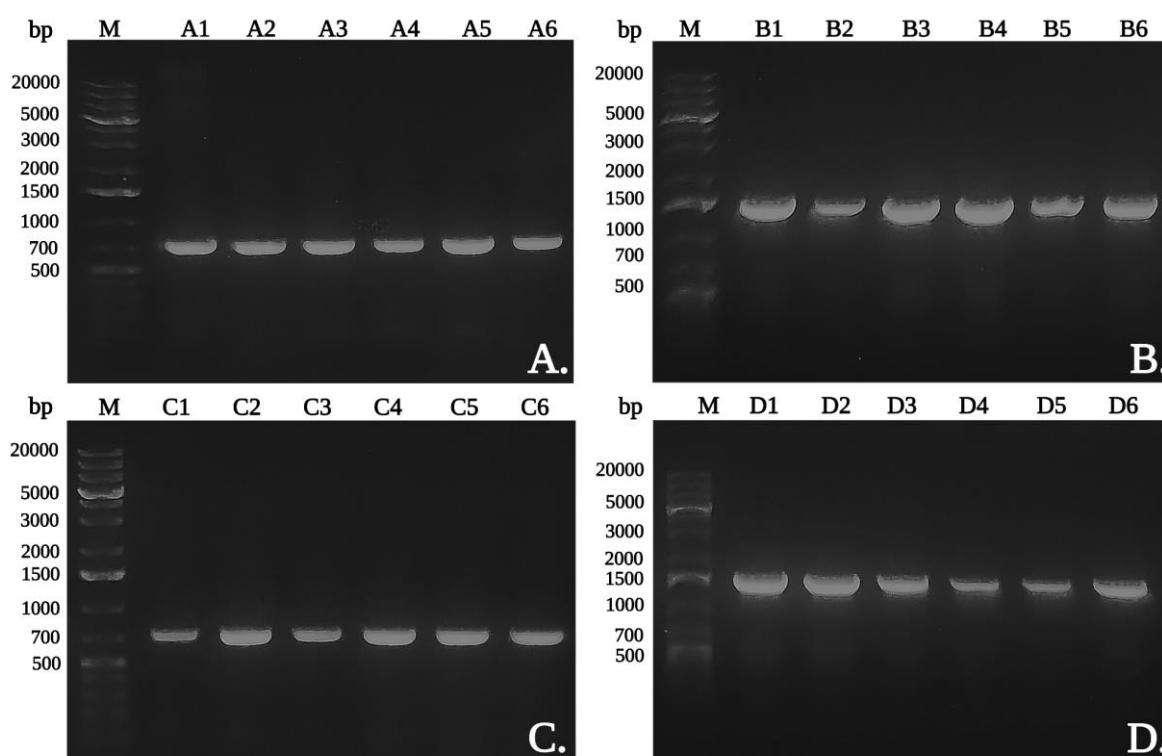


7. ábra: NcoI restriktációs emésztések eredménye pOptiVec-IpiliLC és pOptiVec-IpiliHC vektorok esetében, AGE módszerrel ellenőrzött

(M: Molekulasúly létra (GeneRuler 1 kb Plus); **A.:** A1-A3. Ipili LC (**Amplikon méret:** 1665 bp és 3446 bp), A4-A6. Ipili HC (**Amplikon méret:** 2367 bp és 3446 bp). **B.:** SnapGene gélelektroforézis szimuláció, azonos emésztésekkel: B1-B3. Ipili LC, B4-B6. Ipili HC; **C.:** Ipilimumab LC gént tartalmazó pOptiVec-IpiliLC vektor térkép, jelölve NcoI enzimmel kiasított szegmens; **D.:** Ipilimumab HC gént tartalmazó pOptiVec-IpiliHC vektor térkép, jelölve NcoI enzimmel kiasított szegmens)

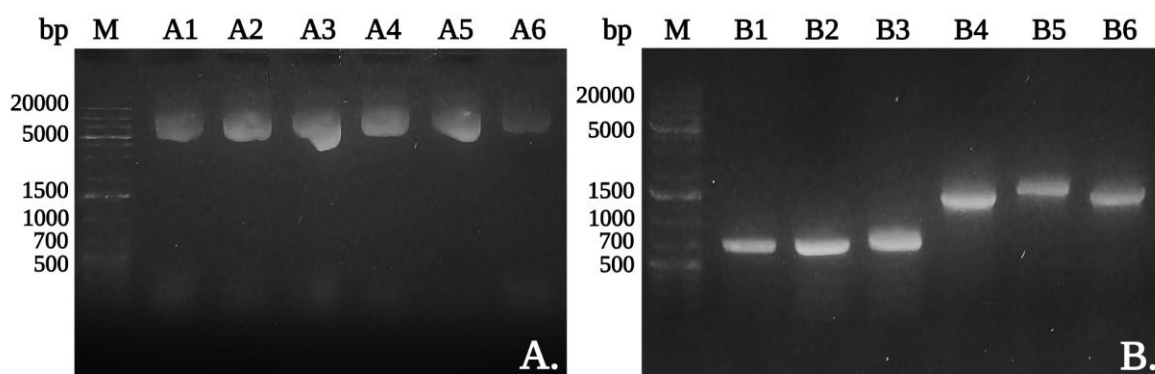
4.1.2. pcDNA3.3 Ipilimumab LC és HC expressziós vektor

pcDNA3.3 expressziós vektor esetében a kotranszfekcióhoz szükséges konstrukciók ellenőrzése a 8. ábrán bemutatott kolónia PCR termékek kiválasztása alapján történt, amely során a 12 Ipilimumab LC és 12 Ipilimumab HC gént tartalmazó telep közül 3-3 tiszta szegmenst eredményező *E. coli* baktérium teleppel folytattuk a további vizsgálatokat. A 8.A és 8.C ábrán 700 bp nagyságban látható a pcDNA3.3-IpiliLC vektor 720 bp méretű könnyű lánc régiója, illetve a 8.B és 8.D ábrán 1500 bp-nál a pcDNA3.3-IpiliHC vektor 1422 bp méretű nehéz lánc régiója. A megfelelő pcDNA3.3-IpiliLC telepek az A3, C2, C5, illetve a B6, D2, D3 pcDNA3.3-IpiliHC telepek.



8. ábra. Kolónia PCR során amplifikált, Ipilimumab LC és HC gént hordozó pcDNA3.3 vektorral transzformált *E. coli* telepek ellenőrzése agaróz gélelektroforézis módszerrel. (M: Molekulasúly létra (GeneRuler 1 kb Plus); **A.:** A1-A6. Ipili LC; **B.:** B1-B6. Ipili HC; **C.:** C1-C6. Ipili LC; **D.:** D1-D6. Ipili HC)

A telepek kiválasztását követően plazmid izolálást végeztünk, mely eredményét a 9. ábra szemlélteti. A 9.A ábrán a telepek plazmid (teljes vektorok) izolálásnak eredménye látható, mellette a 9.B ábrán ellenőrzésként ugyanazon minták PCR termékei, ahol elkülönülnek A1-3.-ig a könnyű és A4-A6.-ig a nehéz lánc régiók. A teljes pcDNA3.3-IpiliLC vektor 6136 bp (A1-A3), melyből 720 bp (B1-B3) az Ipilimumab LC, míg pcDNA3.3-IpiliHC vektor esetében a teljes méret 6838 bp (A4-A6) melyből 1422 bp (B4-B6) az Ipilimumab HC régió.

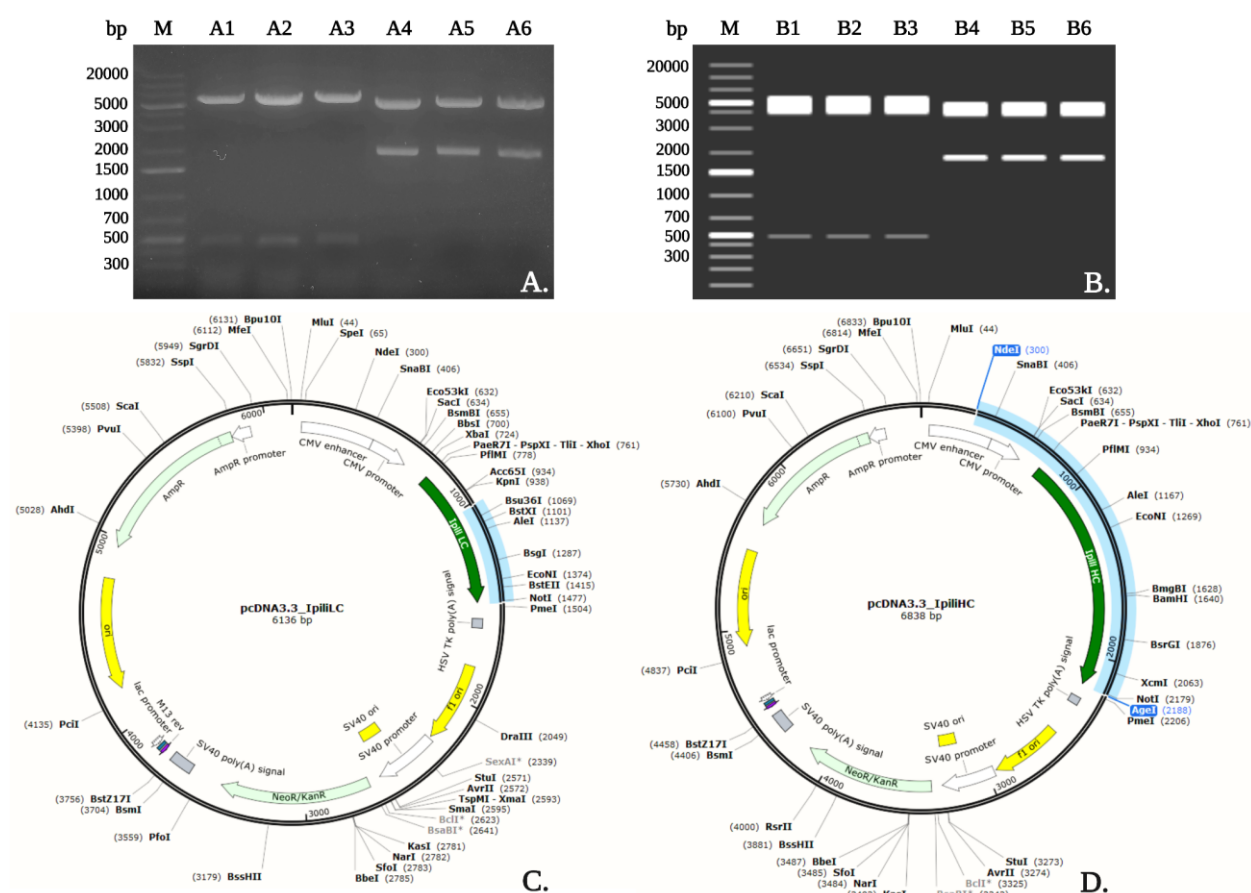


9. ábra: pcDNA3.3-IpiliLC és pcDNA3.3-IpiliHC vektor izolálás sikerességének ellenőrzése AGE módszerrel, referenciaként az adott minták PCR termékei
(M: Molekulasúly létra (GeneRuler 1 kb Plus); **A.:** Izolált vektorok, A1-A3. pcDNA3.3-IpiliLC, A4-A6. pcDNA3.3-IpiliHC; **B.:** PCR termékek, B1-B3. Ipili LC; B4-B6. Ipili HC)

A 10. ábrán látható a restrikciós endonukleáz emésztések *in silico* és a kísérleti eredmények összehasonlítása mindkét vektor konstrukció esetében. A 10.A és 10.B ábrán A1-A3, B1-B3 pcDNA3.3-IpiliLC konstrukciók AgeI restrikciós enzim emésztés során azonos, 477 bp és 5659 bp nagyságú amplikont eredményeztek minden minta esetén.

A pcDNA3.3-IpiliHC konstrukciók A4-A6, B4-B6 minták esetében AgeI+NdeI restrikciós emésztés által 1888 bp és 4950 bp méretű szegmenseket hasítottak mindegyik minta esetén *in silico* és *in vitro* kivitelezésben is.

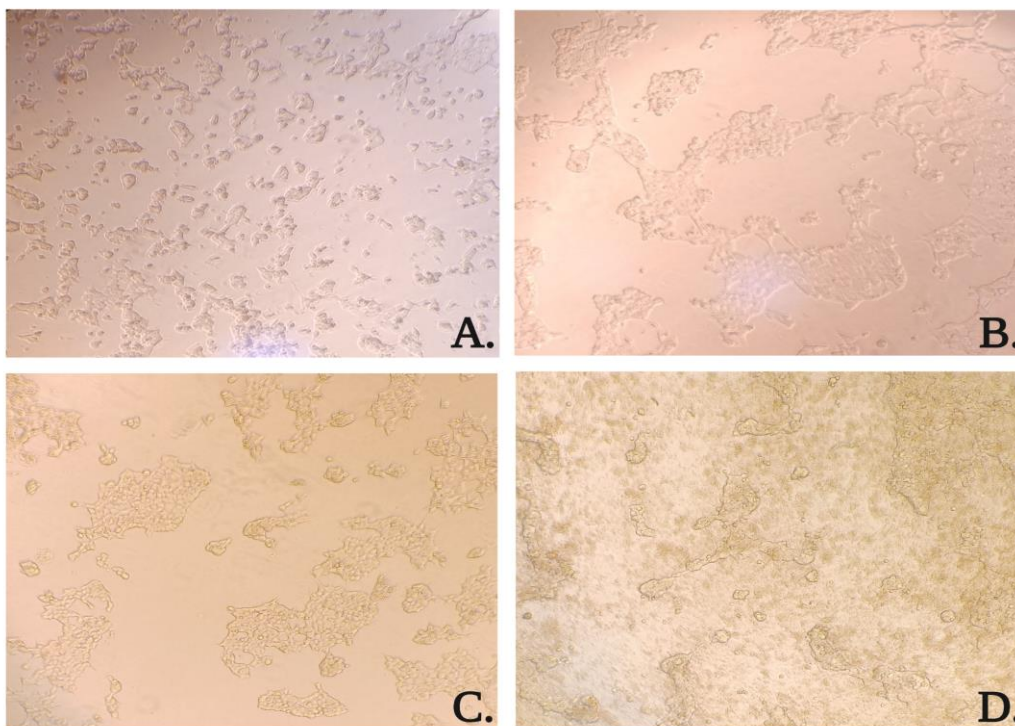
A 10.C és 10.D ábra a teljes, pcDNA3.3-IpiliLC, illetve pcDNA3.3-IpiliHC vektor térképeken az AgeI/AgeI+NdeI általi hasított szegmenseket jelöli, melyen látható, hogy az adott amplikon tartalmazza a kívánt Ipilimumab régiót (LC/HC).



10. ábra: AgeI, illetve AgeI+NdeI restrikciós emésztések eredménye pcDNA3.3-IpiliLC és pcDNA3.3-IpiliHC vektorok esetében, AGE módszerrel ellenőrzött (M: Molekulasúly létra (GeneRuler 1 kb Plus); **A.:** A1-A3. Ipili LC (**Amplikon méret:** 477 bp és 5659 bp), A4-A6. Ipili HC (**Amplikon méret:** 1888 bp és 4950 bp). **B.:** SnapGene általi gélelektroforézis szimuláció azonos emésztésekkel: B1-B3. Ipili LC, B3-B6. Ipili HC; **C.:** Ipilimumab LC gént tartalmazó pcDNA3.3-IpiliLC vektor térkép, jelölve AgeI enzimmel kihalásított szegmens; **D.:** Ipilimumab HC gént tartalmazó pcDNA3.3-IpiliHC vektor térkép, jelölve AgeI+NdeI enzimekkel kihalásított szegmens)

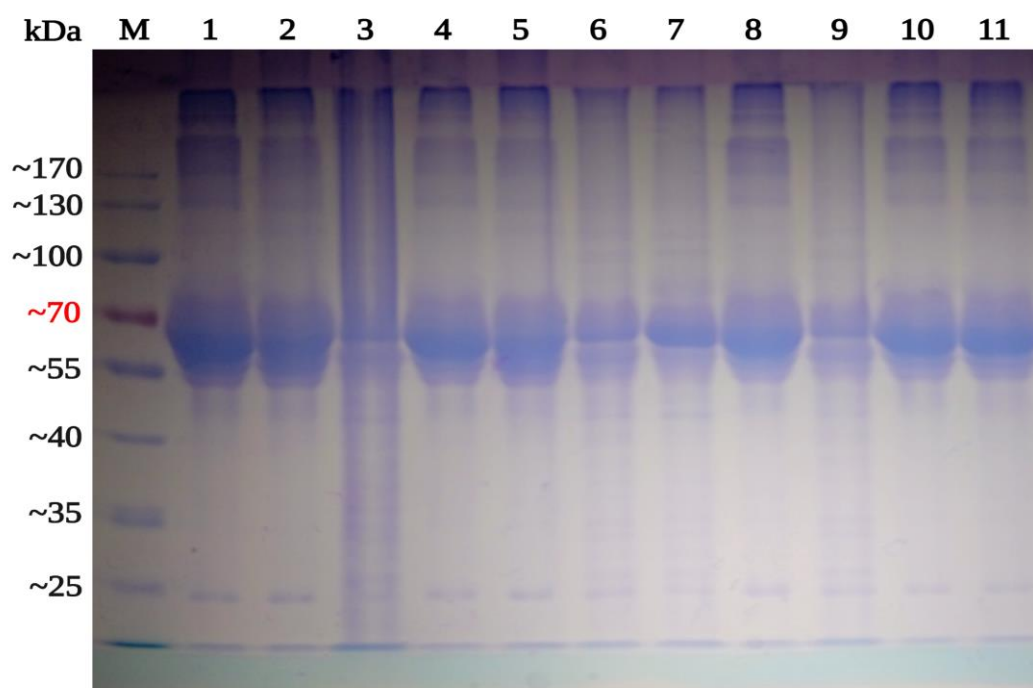
4.2. CaCl_2 alapú kotranszfekció HEK293 humán sejtvonalonban

Az Ipilimumab génjeit tartalmazó vektor konstrukciók expressziójára képes HEK293 adherens sejt vonal előnevelésének, illetve a transzfekciójának eredménye eltérő tenyészetek és fázisok között a 11. ábrán látható. A 11.A ábrán T75 flaskáról mikroplate-re történő passzálás után a 3. órában lévő sejtek állapota figyelhető meg, vagyis elegendő sejtszámmal rendelkeznek és már letapadtak a lemez felületére. A 11.B ábra passzálás után második napon lévő HEK293 sejteket szemlélteti, amelyen látható, hogy a letapadt sejtek elérték a szükséges konfluencia szintet. A 11.C ábrán megfigyelhető a kotranszfekció 1. napján lévő sejt kultúra. A 11.D ábrán látható a sejtek CaCl_2 alapú kotranszfekciójának eredménye 6 nap inkubációs idő elteltével. A 11.D ábrán HEK293 telepek esetében $10,8 \mu\text{g}$ DNS mennyiség bevitele történt.



11. ábra: HEK293 humán adhézios sejtek különböző növekedési fázisokban
(**A.:** Mikroplate-re történő passzálás utáni HEK293; **B.:** Kotranszfekciót megelőzően letapadt HEK293; **C.:** Kotranszfekció 1. nap, HEK293 - $10,8 \mu\text{g}$ DNS esetén; **D.:** Kotranszfekció 6. nap, HEK293 - $10,8 \mu\text{g}$ DNS esetén)

A termelődött rekombináns fehérjének a kimutatása SDS-PAGE módszerrel valósult meg, melynek eredménye a 12. ábrán látható. Az SDS-PAGE eredmény alapján elmondható, hogy minden kotranszfektált minta esetében megfigyelhető 55 és 70 kDa között egy intenzív fehérje sáv, ellenben a kontrollban (3, 6, 9) ez hiányzik. A várt fragmensek méretének meghatározását ExPASy ProtParam szoftver segítségével végeztük el: az LC régióknak 23,45 kDa, míg HC régió esetén 49,25 kDa nagyságú fragmens keletkezik. A jelen gélképen megjelenő fehérje méretének megfelelő kombináció egy LC és HC régió komplex képződésre utal. Az előkészített minták további kezelését végeztük el (hozzáadott 2-Mercaptoethanol és DTT reagensekkel), amely esetben sem sikerült hatékonyabb elválasztást megvalósítani. Figyelembe véve azon tényt, hogy jelen körülmények között végzett gélelektroforézis 5-10% eltérést eredményezhet az ismeretlen fehérje méretének meghatározására vonatkozóan, a kapott fehérje méret megfelelhet a Ipilimumab HC régióknak. Annak következtében, hogy minden mintát feldolgoztunk a kezdeti lépésben a kísérletek újbóli megismétlése vált indokolttá a kotranszfekció lépésétől.



12. ábra: A termelődött antitest kimutatás eredménye SDS-PAGE elválasztással (M: Molekulasúly létra (PageRuler Prestained Protein Ladder); **1:** 1,2 µg DNS 1. Mix; **2:** 10,8 µg DNS 1. Mix; **3:** Kontroll; **4:** 1,2 µg DNS 2. Mix; **5:** 10,8 µg DNS 2. Mix; **6:** Kontroll; **7:** 1,2 µg DNS 3. Mix; **8:** 10,8 µg DNS 3. Mix; **9:** Kontroll; **10:** 1,2 µg DNS 4. Mix; **11:** 10,8 µg DNS 4. Mix)

5. Következtetések

A 12-12, ellenőrzésre kiválasztott Ipilimumab könnyű és nehéz lánc klónozásából származó ligálási termékkel transzformált *E. coli* telep (pOptiVec-IpiliLC, pOptiVec-IpiliHC, illetve pcDNA3.3-IpiliLC, pcDNA3.3-IpiliHC) közül a megfelelő gént amplifikáló primerek használatával, kolónia PCR, valamint AGE módszer segítségével 3-3 tiszta szegmenst eredményező konstrukciót határoztunk meg. Az amplikonok mérete mindkét expressziós vektornál azonos: Ipilimumab LC régió esetén 720 bp, illetve Ipilimumab HC régiónál 1422 bp. A plazmid izolálás során sikeresen igazoltuk a vektorok jelenlétét, amely eredménye megegyezett az *in silico*, SnapGene által tervezett konstrukciók méretével. A könnyű lánc konstrukciók teljes mérete pOptiVec vektor esetén 5111 bp, míg pcDNA3.3 vektornál 6136 bp; a PCR során eredményezett amplikon mindkét esetben 720 bp. A nehéz láncot tartalmazó vektorok teljes mérete pOptiVec-nél 5813 bp és pcDNA3.3 vektor vonatkozásában pedig 6838 bp; a PCR során eredményezett amplikon méret mindkét esetben 1422 bp. Továbbiakban a restrikciós emésztések AGE eredményei alapján elmondható, hogy az Ipili LC és az Ipili HC régiók orientációja megfelelő az adott vektorban.

A HEK293 humán adherens sejtvonal az alkalmazott tenyésztési körülmények között elérte a kotranszfekcióhoz szükséges konfluencia szintet. A rekombináns DNS konstrukciók kotranszfekciója, illetve az SDS-PAGE eredményei alapján sikerült a HEK293 humán gazdaszervezetben történő Ipilimumab monoklonális antitest részleges expressziója.

Eredményeink alapján a keletkezett rekombináns fehérje mérete egy LC és HC régió komplexképződést mutat. Az előkészített minták további feldolgozása során sem sikerült ezen komplex elválasztása. Figyelembe véve azon tényt, hogy jelen körülmények között végzett gélelektroforézis 5-10% eltérést eredményezhet az ismeretlen fehérje méretének meghatározására vonatkozóan, a kapott fehérje méret megfelelhet a Ipilimumab HC régiónak. Annak következtében, hogy minden mintát feldolgoztunk a kezdeti lépésben a kísérletek újbóli megismétlése vált indokolttá a kotranszfekció lépésétől.

6. További célkitűzések

További célkitűzés az Ipilimumab antitest termelésének optimalizálása humán sejtvonalban nagyobb hozam elérése érdekében; a rekombináns fehérje tisztítása; továbbá új módszerek alkalmazása az antitest kimutatására vonatkozóan. Ezen célok megvalósításához a következő lehetséges módosítások szükségesek:

- Más sejtvonal alkalmazása (CHO DG44)
- CaCl_2 mellett további transzfekciós reagens alkalmazása (például kationos lipidek, FreeStyle Max Reagent, Lipofectamine)
- A rekombináns fehérje tisztítása és ellenőrzése (FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Gyors fehérje folyadékkromatográfia) és Kapilláris gélelektroforézis)
- Egyéb fehérje kimutatási módszerek alkalmazása: ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Enzimhez Kötött Immunoszorbens Próba), MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; Mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria)

Köszönetnyilvánítás

Ezúttal szeretném megköszönni a kutatási munkám elvégzésében, illetve a dolgozatom elkészítésében nyújtott önzetlen segítséget dr. Salamon Pál egyetemi tanársegédnek és dr. Orbán Csongor egyetemi docensnek. Ugyanakkor köszönettel tartozok a Sapiientia EMTE Csíkszeredai Kar, Biomérnöki Tanszék oktatóinak és munkatársainak, akik ezen dolgozat elkészítésében segítséget nyújtottak. Továbbá köszönettel tartozom a Corax-Bioner CEU S.A. kutatóintézetnek és a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház Molekuláris diagnosztikai kutató laboratóriumnak az ellenőrzéshez, illetve transzfekcióhoz szükséges rekombináns konstrukciók biztosításáért, valamint a Pécsi Tudományegyetemnek a HEK293 humán sejtvonal biztosításáért.

Irodalomjegyzék

Araujo, P.B. és mtsai. (2015) „Ipilimumab-induced hypophysitis: review of the literature”, *Journal of endocrinological investigation*, 38(11), o. 1159–1166.

Bandaranayake, A.D. és Almo, S.C. (2014) „Recent advances in mammalian protein production”, *FEBS letters*, 588(2), o. 253–260.

Calabrese, L.H., Calabrese, C. és Cappelli, L.C. (2018) „Rheumatic immune-related adverse events from cancer immunotherapy”, *Nature Reviews Rheumatology*, o. 569–579. Elérhető: <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0074-9>.

Camacho, L.H. (2015) „CTLA -4 blockade with ipilimumab: biology, safety, efficacy, and future considerations”, *Cancer Medicine*, o. 661–672. Elérhető: <https://doi.org/10.1002/cam4.371>.

Carrara, S.C. és mtsai. (2021) „From cell line development to the formulated drug product: The art of manufacturing therapeutic monoclonal antibodies”, *International Journal of Pharmaceutics*, o. 120164. Elérhető: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120164>.

Chng, J. és mtsai. (2015) „Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells”, *mAbs*, o. 403–412. Elérhető: <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1008351>.

Dumont, J. és mtsai. (2016) „Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives”, *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), o. 1110–1122.

Esfahani, K. és mtsai. (2020) „A Review of Cancer Immunotherapy: From the Past, to the Present, to the Future”, *Current Oncology*, o. 87–97. Elérhető: <https://doi.org/10.3747/co.27.5223>.

Fésüs (2017) „Az immunonkológia újdonságai a szolid tumorok és a hematológiai daganatok kezelésében – az immunellenőrzőpont-gátlók”, *Magyar Onkológia*, o. 116–125.

Hunter, M. és mtsai. (2019) „Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells”, *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, 95(1), o. e77.

Kiss E. (2019) „Immunológia újabb lehetőségei az onkológiai terápiában = New opportunities for immunology in oncology therapy”, *Central European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 5(2), o. 68–73.

Kunert, R. és Reinhart, D. (2016) „Advances in recombinant antibody manufacturing”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, o. 3451–3461. Elérhető: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9>.

Lacouture, M.E. és mtsai. (2014) „Ipilimumab in patients with cancer and the management of dermatologic adverse events”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, o. 161–169. Elérhető: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.02.035>.

Lipman, N.S. és mtsai. (2005) „Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources”, *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 46(3), o. 258–268.

Lisi, L. és mtsai. (2022) „Clinical experience with CTLA-4 blockade for cancer immunotherapy: From the monospecific monoclonal antibody ipilimumab to probodies and bispecific molecules targeting the tumor microenvironment”, *Pharmacological research: the official journal of the Italian*

Pharmacological Society, 175, o. 105997.

Mahmuda, A. és mtsai. (2017) „Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, o. 713. Elérhető: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i3.29>.

Pistillo, M.P. és mtsai. (2020) „Phenotypic characterization of tumor CTLA-4 expression in melanoma tissues and its possible role in clinical response to Ipilimumab”, *Clinical Immunology*, o. 108428. Elérhető: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108428>.

Psimadas, D. és mtsai. (2012) „Molecular Nanomedicine Towards Cancer: 111In-Labeled Nanoparticles”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, o. 2271–2280. Elérhető: <https://doi.org/10.1002/jps.23146>.

Pulix, M. és mtsai. (2021) „Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories”, *Current opinion in biotechnology*, 71, o. 18–24.

Ribas, A. (2012) „Tumor Immunotherapy Directed at PD-1”, *New England Journal of Medicine*, o. 2517–2519. Elérhető: <https://doi.org/10.1056/nejme1205943>.

Saeed, A.F. ul H. és Saeed, A.F. ul (2016) „Advances in Monoclonal Antibodies Production and Cancer Therapy”, *MOJ Immunology*. Elérhető: <https://doi.org/10.15406/moji.2016.03.00099>.

van der Schoot, J.M.S. és mtsai. (2019) „Functional diversification of hybridoma-produced antibodies by CRISPR/HDR genomic engineering”, *Science advances*, 5(8), o. eaaw1822.

Singh, A., Mishra, A. és Verma, A. (2020) „Antibodies: monoclonal and polyclonal”, *Animal Biotechnology*, o. 327–352. Elérhető: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811710-1.00015-x>.

Spadiut és mtsai. (2014) „Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments”, *Trends in Biotechnology*, o. 54–60. Elérhető: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.002>.

Sun, M.M., M.D...Ph. . és mtsai. (2020) „Uveitis in Patients Treated with CTLA-4 and PD-1 Checkpoint Blockade Inhibition”, *Ocular immunology and inflammation*, 28(2), o. 217–227.

Szekanecz, É. és Szekanecz, Z. (2019) „Az onkológiában alkalmazott immunchekpointgátló terápiák autoimmun mellékhatásai: patogenezis, klinikum és terápia”, *Orvosi Hetilap*, o. 887–895. Elérhető: <https://doi.org/10.1556/650.2019.31392>.

Türk és Rajnavölgyi (2017) „A CTLA-4 rendszer immunológiai és immunonkológiai szerepe: kétélű fegyver?”, *Immunológiai Szemle / Immunology Quarterly* [Preprint]. (11, 1). Elérhető: <https://www.medicina-kiado.hu/kiadvanyaink/folyoiratok/immunologiai-szemle/immunologiai-szemle-2017-1-e-book/> (Elérés: 2023. április 15.).

Wang, Z. és mtsai. (2022) „Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases”, *Molecular Biomedicine*. Elérhető: <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00100-4>.

Zahavi, D. és Weiner, L. (2020) „Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy”, *Antibodies*, o. 34. Elérhető: <https://doi.org/10.3390/antib9030034>.