

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA NATLAČEN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA NATLAČEN

**IZBOR PEPTIDNIH LIGANDOV REGIJE F_c HUMANIH
IMUNOGLOBULINOV G IZ BAKTERIOFAGNE PREDSTAVITVENE
KNJIŽNICE**

**SELECTION OF LIGANDS FOR THE F_c-PORTION OF HUMAN
IMMUNOGLOBULINS G FROM A PHAGE-DISPLAYED PEPTIDE
LIBRARY**

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča. Določitev nukleotidnih zaporedij molekul DNA je opravilo podjetje Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Nemčija.

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču za možnost opravljanja diplomskega dela s področja farmacevtske biotehnologije, posredovano znanje, spodbudo k samostojnemu razmišljanju, a hkrati pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju diplomske naloge, ter nadvse pohvalno nenehno dostopnost za moja vprašanja.

Hvala Petru Molku in Mihi Vodniku za prijetno družbo, pomoč pri delu v laboratoriju in reševanju praktičnih problemov ter njuno pripravljenost deliti svoje znanje z mano.

Hvala družini in Petru za podporo in razumevanje tekom celotnega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag. farm..

Ljubljana, september 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Božič

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner

KAZALO

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE	IV
1 UVOD	I
1.1 Imunoglobulini	1
1.2 Terapevtska monoklonska protitelesa in fuzijski proteini z regijo Fc	2
1.2.1 Terapevtska monoklonska protitelesa.....	2
1.2.1.1 Terapevtska monoklonska protitelesa z izboljšanimi lastnostmi	5
1.2.2 Fuzijski proteini z regijo Fc	6
1.3 Izolacija in čiščenje terapevtskih monoklonskih protiteles	9
1.3.1 Zaključni procesi pri proizvodnji monoklonskih protiteles	9
1.3.2 Afinitetna kromatografija na protein A	10
1.3.3 Alternative proteinu A za uporabo v afinitetni kromatografiji	12
1.3.3.1 Bioafinitetni ligandi	12
1.3.3.2 Sintezni peptidni ligandi	14
1.3.3.3 Sintezni nepeptidni ligandi.....	15
1.3.4 Čiščenje monoklonskih protiteles v prihodnje.....	16
1.4 Predstavitev na bakteriofagu	17
2 NAMEN NALOGE	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 Materiali	21
3.1.1 Kemikalije.....	21
3.1.2 Biološki material.....	22
3.1.3 Pufri, raztopine in gojišča	25
3.1.4 Laboratorijska oprema	28
3.2 Metode	29
3.2.1 Nacepitev bakterij na trdno gojišče in priprava tekočih bakterijskih kultur	29
3.2.2 Afinitetna selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-7 TM na regijo Fc hIgG	30
3.2.3 Afinitetna selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-C7C TM na regijo Fc hIgG.....	32
3.2.4 Pomnoževanje eluatov in izolacija pomnoženih eluatov	32
3.2.5 Določanje titra bakteriofagov v nepomnoženih in pomnoženih eluatih	32
3.2.6 Pomnoževanje in izolacija posameznih fagnih klonov	33

3.2.7	Ocena afinitete pomnoženih eluatov in posameznih fagnih klonov do regije Fc hIgG z encimskoimunskim testom na trdnem nosilcu	34
3.2.7.1	Kvalitativna ocena afinitete nabora bakteriofagov iz pomnoženih eluatov	34
3.2.7.2	Kvalitativna ocena afinitete posameznih fagnih klonov	35
3.2.8	Izolacija in čiščenje bakteriofagne DNA ter določanje nukleotidnega zaporedja inserta...	37
3.2.9	Podrobnejše vrednotenje bakteriofagnih klonov z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo vezave regije Fc hIgG s testi ELISA	38
3.2.9.1	Določanje titra fagnih klonov 1s, 7s in 3n	38
3.2.9.2	Kvalitativna ocena afinitete fagnih klonov do humane regije Fc infliksimaba.....	38
3.2.9.3	Vrednotenje specifičnosti fagnih klonov s kvantitativnimi testi ELISA.....	39
3.2.9.4	Kompetitivni test ELISA vezave bakteriofagnih klonov	42
3.2.10	Kvalitativno vrednotenje vezave sinteznega peptida na humano regijo Fc z "imunoprecipitacijo" in sledečim testom točkovnega nanosa (ang. dot blot).....	43
4	<i>REZULTATI IN RAZPRAVA</i>	44
4.1	Afinitetni selekciji bakteriofagov iz knjižnic Ph.D.-7TM in Ph.D.-C7CTM na regijo Fc hIgG	44
4.1.1	Vrednotenje poteka selekcije s spremljanjem deleža eluiranih bakteriofagov	44
4.1.2	Kvalitativna ocena afinitete nabora bakteriofagov iz pomnoženih eluatov	46
4.1.3	Kvalitativna ocena afinitete posameznih fagnih klonov	47
4.1.4	Nukleotidna zaporedja insertov in ustrezajoča aminokislinska zaporedja peptidov.....	50
4.1.5	Podrobnejše vrednotenje bakteriofagnih klonov z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo vezave regije Fc hIgG s testi ELISA	51
4.1.5.1	Kvalitativna ocena afinitete fagnih klonov do humane regije Fc infliksimaba.....	52
4.1.5.2	Vrednotenje specifičnosti fagnih klonov s kvantitativnimi testi ELISA.....	53
4.1.5.3	Kompetitivni test ELISA vezave bakteriofagnih klonov	57
4.1.6	Kvalitativno vrednotenje vezave sinteznega peptida na humano regijo Fc z "imunoprecipitacijo" in sledečim testom točkovnega nanosa (ang. dot blot).....	59
5	<i>SKLEP</i>	61
6	<i>LITERATURA</i>	63

POVZETEK

Monoklonska protitelesa in fuzijski proteini s humano regijo Fc predstavljajo pomembno skupino bioloških učinkovin. Za njihovo izolacijo iz gojišč praviloma uporabljamo afinitetno kromatografijo na osnovi stafilokoknega proteina A, ki pa ima kot ligand številne slabosti. Njegova uporaba je povezana s težavami že pri sami proizvodnji rekombinantne oblike liganda, visokimi stroški, možnostjo prisotnosti nevarnih kontaminantov in odpuščanja imunogenih molekul proteina A z nosilca, nestabilnostjo liganda v postopku čiščenja opreme in ostrimi pogoji, ki so potrebni za elucijo produkta iz kolone. Alternativno predstavljajo sintezni (peptidni) ligandi, ki so proteolitično obstojnejši, cenejši in manj imunogeni, njihova priprava je enostavnejša, izražajo nižjo afiniteto do imunoglobulinov in zato omogočajo elucijo produkta pod milejšimi pogoji.

V okviru diplomskega dela smo z metodo predstavitve na bakteriofagu skušali najti peptid, ki bi bil kot ligand v afinitetni koloni uporaben za izolacijo humanih imunoglobulinov G. Afinitetna selekcija iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice naključnih cikličnih heptapeptidov ni bila uspešna, medtem ko smo iz knjižnice naključnih linearnih heptapeptidov preko treh selekcijskih stopenj poiskali ligande humane regije Fc. Interakcijo izbranih rekombinantnih bakteriofagov s tarčnim proteinom smo ovrednotili s prirejenima encimskoimunskima testoma na trdnem nosilcu (ELISA). Osmim fagnim klonom z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo vezave regije Fc smo določili nukleotidna zaporedja insertov in njim ustrezajoča aminokislinska zaporedja predstavljenih peptidov. Peptid z aminokislinskim motivom H-K/T-V/I-T-S-S/Y-I/L je najverjetneje odgovoren za interakcijo z regijo Fc humanega IgG. Specifičnost vezave na fragment Fc izbranih fagnih klonov smo potrdili a) s tremi kvantitativnimi testi ELISA, pri dveh smo nad različnimi površinskimi gostotami adsorbiranega tarčnega proteina inkubirali enako število fagov posameznih klonov, pri enem pa smo nad enako količino imobiliziranih molekul regije Fc inkubirali suspenzije različnih titrov posameznih fagnih klonov, in b) s kompetitivno različico testa ELISA, pri katerem smo vzorcem dodajali različne koncentracije topne regije Fc. Ugotovili smo, da s humano regijo Fc himernega protitelesa infliksimaba (IgG₁) izbrani fagni kloni ne interagirajo. Z "imunoprecipitacijo" in sledečim testom točkovnega nanosa smo potrdili, da sintezni peptid, po aminokislinskem zaporedju enak peptidu, predstavljenem na izbranem fagnem klonu, kljub izgubi učinka avidnosti ohranja opazno afiniteto do humane regije Fc.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies and Fc fusion proteins represent an important group of biological agents. For their isolation from the cell culture media, affinity chromatography based on staphylococcal protein A is normally used. Despite its extended use, protein A suffers from a number of problems, including difficulties in isolation and purification from microbial extracts, high cost, possibility of presence of potentially hazardous contaminants and leakage of immunogenic protein A into the product, poor stability of the matrix to cleaning agents, and harsh conditions required for the elution of the product from the column. Synthetic (peptide) ligands represent an alternative to protein A, having the advantage of being more stable, less immunogenic and less expensive than protein ligands, their preparation is simpler and because of their lower affinity for immunoglobulins, elution of the product can be achieved under milder conditions.

The aim of our research was to identify a peptide ligand which could be useful for the isolation of immunoglobulins G by affinity chromatography. The affinity selection from phage-displayed library of random cyclic heptapeptides was not successful, but by biopanning a library of random linear heptapeptides, ligands for human Fc region were found. For the evaluation of interaction of selected recombinant phages with target protein, modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used. Eight phage clones with the estimated highest affinity and selectivity for the Fc region were chosen, sequences of their oligonucleotide inserts and the corresponding primary structures of displayed peptides were determined. Peptide with the amino acid motif H-K/T-V/I-T-S-S/Y-I/L is most likely responsible for the interaction with Fc region of human IgG. The specificity of selected phage clones to the Fc fragment was confirmed by a) three quantitative ELISA, in two of which different surface densities of adsorbed target protein were incubated with the same titer of individual phage clones, whereas in one of them the same amount of immobilized Fc region was incubated with suspensions of increasing titers of individual phage clones; b) a competitive version of ELISA, in which increasing concentrations of soluble Fc region were added to the samples. It was discovered that selected phage clones do not interact with infliximab, a chimeric monoclonal antibody with an IgG₁ human Fc region. By “immunoprecipitation” and subsequent dot blot analysis we have confirmed that synthetic peptide, with the same amino acid sequence as phage-displayed peptide, retains considerable affinity for human Fc region, despite the loss of avidity effect.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADCC	s protitelesi posredovana celična citotoksičnost (ang. antibody dependent cell cytotoxicity)
ADCP	s protitelesi posredovana celična fagocitoza (ang. antibody dependent cell phagocytosis)
AK	aminokislina
AKA	afinitetna kromatografija na protein A
AKG	afinitetna kromatografija na protein G
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
CDC	s komplementom posredovana citotoksičnost (ang. complement dependent cytotoxicity)
CDR	komplementarnost določujoča regija oz. hipervariabilna zanka (ang. complementarity determining region)
C _H	konstantno področje težke verige
C _L	konstantno področje lahke verige
Da	dalton, enota za relativno molekulsko maso
ddH ₂ O	ultra čista voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimskoimunski test na trdni podlagi (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
FcRn	neonatalni receptor za regijo Fc IgG
FcγR	receptor za regijo Fc IgG
Fv	variabilni fragment protitelesa, sestavljen iz regij V _L in V _H protitelesa
g	gravitacijski pospešek (9,81 m/s ²)
hIgG	humani imunoglobulin G
HRP	hrenova peroksidaza (ang. horseradish peroxidase)
Ig	imunoglobulin
LB	Luria-Bertanijevo gojišče
mAb	monoklonsko protitelo
n	oznaka pomnoženih (PE) in nepomnoženih eluatov (NE) ter fagnih klonov, pridobljenih s selekcijo z nespecifično elucijo na regijo Fc hIgG vezanih fagov
NE	nepomnoženi eluat
NK	negativna kontrola
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. phosphate-buffered saline)
PBST	pufer PBS z dodanim polisorbitom-20 (Tween [®] 20)
PE	pomnoženi eluat
PEG	polietilenglikol
pfu	plakotvorna enota (ang. plaque forming unit)
PK	pozitivna kontrola
s	oznaka pomnoženih (PE) in nepomnoženih eluatov (NE) ter fagnih klonov, pridobljenih s selekcijo s specifično elucijo na regijo Fc hIgG vezanih fagov
scFv	enoverižni variabilni fragment protitelesa (ang. single chain variable fragment)
SK	slepa kontrola
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
V _H	variabilno področje težke verige
V _L	variabilno področje lahke verige
vrt./min	število vrtljajev na minuto

KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE

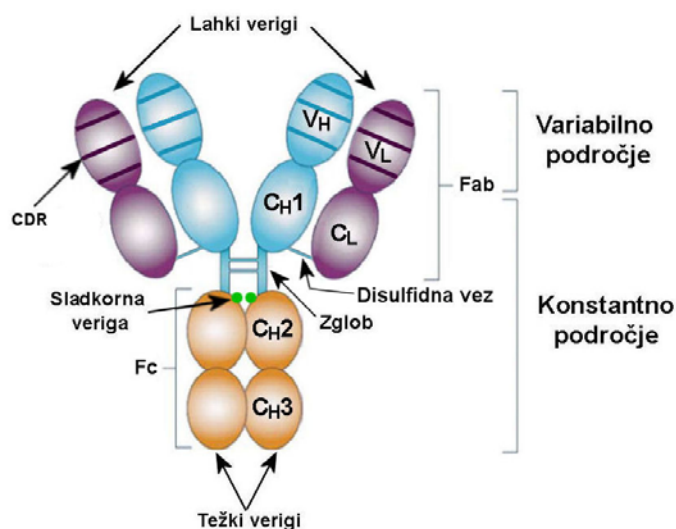
A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	asparaginska kislina
C	Cys	cistein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	glutaminska kislina
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
L	Leu	levcin
K	Lys	lizin
M	Met	metionin
F	Phe	fenilalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin
V	Val	valin

1 UVOD

1.1 Imunoglobulini

Imunoglobulini ali protitelesa so del humoralne in pridobljene oz. specifične imunosti višjih živali. So globularni glikoproteini z navidezno molekulsko maso večjo od 150 kDa, pri elektroforezni ločbi na acetatni celulozi predstavljajo frakcijo γ -globulinov. V krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih se nahajajo v obliki prostih molekul. Na površini limfocitov B imajo vlogo receptorja za specifične antigene. Zrela protitelesa izločajo po antigenski aktivaciji limfocitov B nastale plazmatke (1, 2).

Osnovna zgradba vseh vrst protiteles večine sesalcev je podobna. Monomerne enote imajo simetrično strukturo v obliki črke ipsilon. Sestavljene so iz dveh identičnih težkih polipeptidnih verig (γ , μ , α , ϵ ali δ) in dveh enakih lahkih polipeptidnih verig (κ ali λ), med seboj povezanih s štirimi disulfidnimi vezmi (slika 1) (1).



Slika 1: Zgradba molekule IgG (prirejeno po 3).

Težka in lahka polipeptidna veriga sta sestavljeni iz konstantnih predelov na C- in variabilnih regij na N-koncu. Raznolikost aminokislinske sestave variabilnega področja omogoča osnovno funkcijo protitelesa – prepoznavo in vezavo specifičnega antigena. Po trije krajši odseki znotraj variabilnih regij težke in lahke verige namreč tvorijo hipervariabilno zanko oz. komplementarnost določujočo regijo (CDR), ki določa strukturno skladnost vezavnega mesta protitelesa z epitopom antigena (slika 1). Za

konstantna področja je značilna podobnost v aminokislinski zgradbi, razlike znotraj konstantnih področij težke verige pa določajo vrsto težke verige in s tem razred ter podrazred protitelesa. Poznamo pet razredov oz. izotipov protiteles: IgG, IgM, IgA, IgE in IgD. Znotraj razreda IgA ločimo dva podrazreda (IgA₁ in IgA₂), znotraj razreda IgG pa štiri podrazrede protiteles (IgG₁, IgG₂, IgG₃ in IgG₄). Konstantne regije težkih verig so odgovorne za interakcijo protitelesa z drugimi elementi imunskega sistema oz. so nosilci bioloških funkcij protitelesa (1, 2).

IgG predstavljajo večino protiteles v krvi, so glavna protitelesa sekundarnega imunskega odziva. IgM so pentameri in se zaradi svoje velikosti nahajajo izključno v serumu. So prevladujoča protitelesa primarnega imunskega odziva. IgA v dimerni obliki so glavni tip protiteles v telesnih izločkih. Preprečujejo pritrnitev bakterij in virusov na sluznico in s tem vstop antigenov v organizem. Novorojenček jih prejme z materinim mlekom, kar mu omogoča zaščito pred črevesnimi okužbami. IgE imajo pomembno vlogo pri obrambi organizma pred paraziti. Sodelujejo pri nastanku od IgE posredovane alergijske preobčutljivosti, saj sproščajo vnetne in vazoaktivne mediatorje iz znotrajceličnih granul mastocitov in bazofilcev. IgD se izražajo na površini limfocita B v stopnji diferenciacije celice, vloga serumskega IgD še ni razjasnjena (1).

1.2 Terapevtska monoklonska protitelesa in fuzijski proteini z regijo Fc

1.2.1 Terapevtska monoklonska protitelesa

Zaradi visoke specifičnosti in afinitete do tarčnih molekul so protitelesa dobri kandidati za zdravilne učinkovine. Iz biotehnološkega vidika so najpomembnejša protitelesa razreda G. Pri proteolitični razgradnji IgG s papainom nastane fragment Fc in dva enaka fragmenta Fab. Fragment Fc je sestavljen iz konstantnih domen težkih verig C_{H2} in C_{H3}, fragment Fab pa sestavljajo variabilna področja težke in lahke verige (domeni V_H in V_L), konstantno področje lahke verige (domena C_L) in konstantno področje težke verige (domena C_{H1}) (slika 1). Fragmenta Fab imata po en paratop, fragment Fc nima možnosti vezave antigena, vendar je nosilec bioloških funkcij protitelesa (2, 3).

Trije najpomembnejši efektorski mehanizmi IgG so s protitelesi posredovana celična citotoksičnost (ADCC), s kompleментом posredovana citotoksičnost (CDC) in s

protitelesi posredovana celična fagocitoza (ADCP). S predelom Fab molekule IgG vežejo antigen, s fragmentom Fc pa interagirajo s specifičnim receptorjem Fc γ R na površini efektorskih celic. Protitelesa na ta način podelijo antigensko specifičnost nespecifičnim celicam, celicam naravnim ubijalkam in eozinofilcem, kar vodi do lize tarčnih celic (ADCC), opsonizacija antigenska delca pa olajša fagocitozo le-tega makrofagom, monocitom in nevtrofilcem (ADCP). Interakcija regije Fc s prvo komponento komplemeta C1q sproži kaskado reakcij komplemeta (CDC) (1, 3).

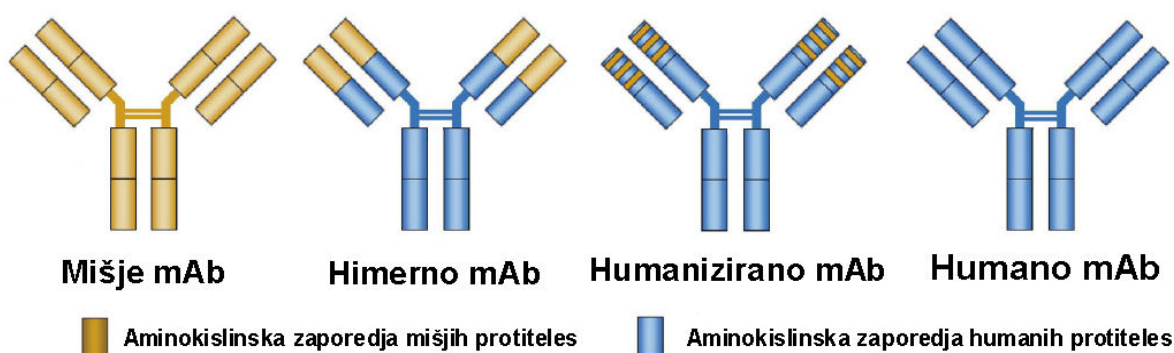
Največjo biološko učinkovitost izkazujejo molekule IgG₁, zato so najprimernejše kot terapevtska mAb. V nekaterih primerih pri tovrstnih učinkovinah izkoriščamo zgolj njihovo sposobnost vezave specifičnega antigena in antagonistično delovanje mAb (2, 3). Terapevtska mAb predstavljajo eno najpomembnejših skupin bioloških zdravil (4). Uporabljamo jih za zdravljenje raka, avtoimunskih in infekcijskih bolezni, na področju kardiovaskularnih motenj in za preprečevanje zavrnitve presadkov (2).

Prva oblika terapevtskih mAb so bila protitelesa mišjega izvora. Z uporabo hibridomske tehnologije sta jih pripravila Köhler in Milstein (5). Osnova tehnike je priprava hibridomov z združitvijo mielomske celice s sposobnostjo neomejene celične delitve in limfocita B, ki proizvaja proti izbranemu antigenu specifična protitelesa. Zaradi razlik v aminokislinski zgradbi mišjega in humanega Ig je imunogenost mišjih mAb visoka, kar omejuje njihovo uporabo v terapiji. Kronična terapija z mišjimi mAb pri človeku izzove imunski odziv imenovan HAMA (ang. human anti-mouse antibody), torej tvorbo človeških protiteles proti mišjim Ig. Velik očistek in manjša biološka aktivnost (ADCC in CDC) mišjih mAb v človeškem organizmu zmanjšujeta njihovo terapevtsko učinkovitost (6).

Omenjene pomanjkljivosti so skušali odpraviti z razvojem himernih mAb. Z uporabo tehnologije rekombinantne DNA so pripravili protitelo, sestavljeno iz variabilnih predelov mišjega in konstantnih regij humanega protitelesa (slika 2) (7). Aminokislinsko zaporedje himernega mAb se v 67 % ujema s primarno strukturo humanega Ig (4), kar se odraža v večji biološki aktivnosti in nižji imunogenosti tovrstnih učinkovin v primerjavi z mišjimi mAb (8). Organizem lahko ob večkratnem odmerjanju nanje še vedno odreagira s tvorbo humanih protiteles proti himernim protitelesom, imunski odziv označuje kratica HACA (ang. human anti-chimeric antibody) (8).

Sledil je razvoj humaniziranih mAb, katerih primarna zgradba je v 90-95 % enaka aminokislinskemu zaporedju humanih Ig (4). Odziv imunskega sistema nanje v obliki nastanka humanih protiteles proti humaniziranim protitelesom, imenovan HAHA (ang. human anti-humanized antibody), je pri pacientih precej redkejši v primerjavi z reakcijo organizma na mišja in tudi himerna mAb (8). Priprava humaniziranih mAb zajema vključitev nukleotidnih zaporedij, ki nosijo zapis za hipervariabilne regije težke in lahke verige mišjega Ig, v gena za težko in lahko verigo človeškega protitelesa (slika 2). Humanizirana mAb so izkazovala zmanjšano afiniteto vezave antigena v primerjavi z mišjim protitelesi. Težavo so v veliki meri odpravili z zamenjavo tistih aminokislin humanega dela humaniziranega protitelesa, ki pripomorejo k nativni konformaciji zank CDR, z ustreznimi aminokisljinami mišjega Ig. Novejši pristopi humanizacije omogočajo pripravo humaniziranih mAb z ohranjeno afiniteto vezave antigena (9).

Uporaba transgenih miši in metoda predstavitve na bakteriofagu omogočata pridobivanje humanih mAb. Priprava transgenih miši zajema zamenjavo mišjih genov za težko in lahko verigo protitelesa s človeškimi. Miši imuniziramo s specifičnim antigenom in nastale limfocite B uporabimo za izdelavo hibridomov (10). Učinkovito in visoko zmogljivo presejanje rekombinantnih imunskih, neimunskih (naivnih) ali polysinteznih knjižnic Ig, ki omogoča izolacijo za antigen specifičnega protitelesa, ima pri pripravi humanih mAb prednost pred zamudno izdelavo hibridomov. Osnova najbolj razširjene tehnike presejanja knjižnic je predstavitev fragmenta Fab ali enoverižnega variabilnega fragmenta scFv, kot fuzijskega proteina s plaščnim proteinom pIII, na površini nitastega bakteriofaga. Protitelesa so lahko predstavljena tudi na površini kvasovk, kot je *Saccharomyces cerevisiae*, ali na ribosomu (11). Humana mAb izkazujejo zanemarljivo imunogenost, saj jih sestavljajo aminokislinska zaporedja človeških Ig (2) (slika 2).



Slika 2: Primerjava mišjih, himernih, humaniziranih in humanih mAb (prirejeno po 3).

1.2.1.1 Terapevtska monoklonska protitelesa z izboljšanimi lastnostmi

S pripravo rekombinantnih oblik so uspeli zmanjšati imunogenost terapevtskih mAb. K nadaljnjemu zmanjšanju imunogenosti pripomore tudi vezava polietilenglikolnih verig (PEG) na molekulo Ig (12), z monomernim derivatom mAb (tolerogenom, saj z antigenom na površini celice ne interagira) inducirana imunska toleranca za učinkovino pri pacientu (13), uporaba mAb, katerih tarča so limfociti B (8), sprememba aminokislinskega zaporedja znotraj mAb tako, da je interakcija antigena (mAb), vezanega na poglobitni histokompatibilnostni kompleks razreda I in/ali II, z limfocitom T šibkejša oz. onemogočena (6), v nekaterih primerih pa je tvorbo neželenih protiteles proti mAb mogoče omiliti s sočasnim jemanjem imunosupresivnih zdravil (8). Nadalje so si prizadevali izboljšati tudi druge pomembne lastnosti terapevtskih mAb, kot so afiniteta (3), efektorske funkcije in farmakokinetika (biološka razpolovna doba in prehajanje mAb v tkivo) učinkovine.

Z zmanjšanjem vsebnosti fukoze v oligosaharidu, ki je pripet na fragment Fc, in z zamenjavo določenih aminokislin znotraj fragmenta Fc so izboljšali interakcijo regije Fc z Fc γ R in s tem povečali sposobnost ADCC protitelesa. S spremembo nekaterih aminokislin znotraj področja C_{H2} so izboljšali vezavo protitelesa na molekulo C1q in na ta način povečali sposobnost CDC protitelesa. Oboje prispeva k povečanju terapevtske učinkovitosti protitelesa (3, 6, 14). Nosilci novih funkcij so konjugati protiteles ali fragmentov Ig, sposobnih vezave antigena, z različnimi efektorskimi molekulami, kot so citotoksične učinkovine, encimi in radionuklidi (15) ter citokini (16). Protitelo omogoča usmerjen transport efektorja k tarčnim celicam, kar močno zmanjša neželene stranske učinke tovrstnih učinkovin. Zanimiva so tudi bispecifična protitelesa z vezavnima mestoma za dva različna antigena, kar jim daje sposobnost povezovanja tarčnega antigena z efektorško celico in omogoča tudi pripravo konjugatov z že prej omenjenimi efektorskimi molekulami (17).

Regija Fc določa biološko razpolovno dobo IgG. Neonatalni Fc-receptor (FcRn), izražen na površini endotelijskih celic, interagira s področjem med predeloma C_{H2} in C_{H3} regije Fc ter na ta način preprečuje razgradnjo IgG. Interakcija je pogojena s pH medija. Vezava fragmenta Fc na FcRn je močna pri rahlo kislem pH, pri nevtralnih pogojih pa je interakcija šibkejša, kar vodi v razpad protitelesa (18). Z zamenjavo aminokislin, odgovornih za vezavo regije Fc na FcRn, so pripravili protitelesa, katerih interakcija z

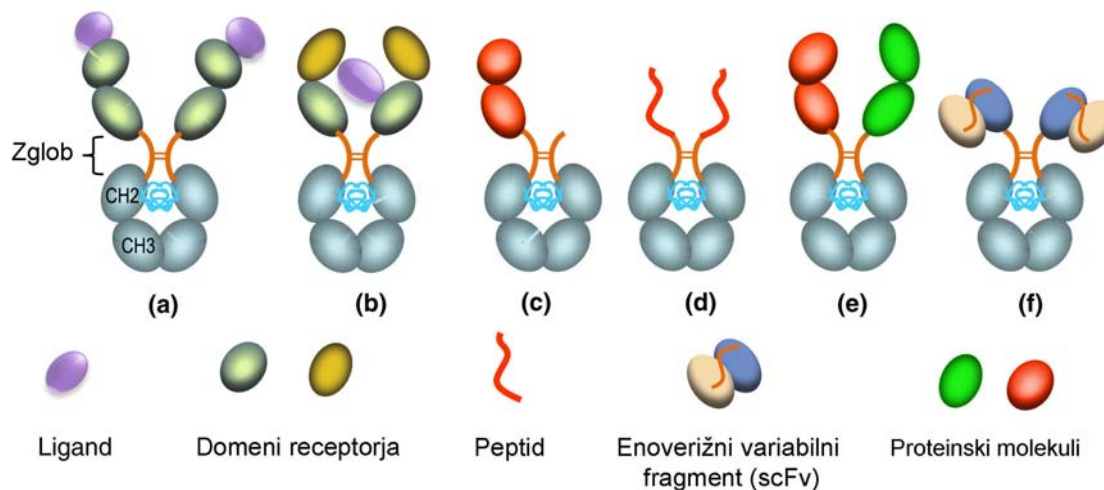
FcRn pri pH 6 je močnejša oz. šibkejša in na ta način povečali oz. zmanjšali biološko razpolovno dobo učinkovin (6, 14, 18). Biološko razpolovno dobo je protitelesu ali fragmentu protitelesa mogoče povečati tudi z vezavo albumina (preko genske fuzije ali kemijske (kovalente ali nekovalentne) konjugacije protitelesa oz. njegovega fragmenta z albuminom) (14), sladkorne verige (14) ali verig PEG (pegilacija) (12) na molekulo IgG ali njen fragment. S pegilacijo molekule povečamo tudi njeno topnost in proteolitično stabilnost, usmerjena vezava verig pa ohranja sposobnost vezave antigena. Verige PEG lahko zakrivajo določene dele IgG in tako preprečujejo efektorske funkcije protitelesa preko Fc γ R (12).

Protitelo z molekulsko maso 150 kDa slabo prehaja v tkivo in se počasi izloča iz organizma. Z odstranitvijo celotne regije Fc ali le njenega dela so pripravili fragmente protiteles, kot so antigen-vezavni fragment (Fab), enoverižni variabilni fragment (scFv), diatelesa (ang. diabodies), tritelesa (ang. tribodies) in minitelesa (ang. minibodies) (19). Zanje je značilen večji očistek, torej krajša izpostavljenost organizma učinkovini in njenim neželenim stranskim učinkom, ter boljše prehajanje v tumorsko tkivo. V primerjavi z IgG dimerne oblike fragmentov protiteles navadno ne izkazujejo zmanjšanja afinitete, medtem ko monomerni fragmenti lahko kažejo zmanjšano sposobnost vezave antigena zaradi izgube efekta avidnosti. V primerjavi s celimi protitelesi, ki jih pridobivamo v sesalskih celicah, je pridobivanje fragmentov enostavnejše in cenejše, saj jih v velikih količinah lahko proizvajajo bakterije.

1.2.2 Fuzijski proteini z regijo Fc

Fuzijski proteini z regijo Fc so rekombinantne oblike proteinov, sestavljene iz fragmenta Fc IgG in proteina, kot so zunajcelična domena receptorja, encim in hormon, ali peptida. V tovrstnih učinkovinah so združene številne pomembne lastnosti protiteles z biološko aktivnostjo druge proteinske molekule. Priprava fuzijskih oblik s fragmentom Fc je omogočila podaljšanje biološke razpolovne dobe izbrani molekuli, zaradi interakcije regije Fc z FcRn, pa tudi zaradi same velikosti fuzijskih proteinov. Ti se namreč nahajajo v homodimerni obliki, zaradi velikosti molekule pa je očistek učinkovine zmanjšan. S pripenjanjem regije Fc lahko podaljšamo biološko razpolovno dobo tudi fragmentom protiteles, kot je npr. scFv (slika 3f). Jakost interakcije homodimerne oblike molekul z ligandom je zaradi učinka avidnosti visoka. Od fragmenta Fc odvisne funkcije protiteles so

zaželene pri pripravi fuzijskih proteinov s protitumorskim delovanjem, regija Fc izboljša tudi topnost in stabilnost proteinskega partnerja. Prisotnost fragmenta Fc omogoča visoko stopnjo izražanja fuzijskih proteinov v ekspresijskih sistemih in čiščenje produkta z afinitetno kromatografijo na protein A. Tako fuzijski proteini z regijo Fc v terapiji postajajo alternativa mAb (20).



Slika 3: Primeri fuzijskih proteinov z regijo Fc: a) fuzijski protein zunajcelične domene receptorja in regije Fc; b) fuzijski protein zunajceličnih domen večkomponentnega receptorskega sistema in regije Fc; c) monomerni fuzijski protein; d) fuzijski protein peptida in regije Fc; e) heterodimerni fuzijski protein; f) fuzijski protein scFv in regije Fc (prirejeno po 20).

Fuzijski proteini zunajcelične domene receptorja in fragmenta Fc (slika 3a), imenovani tudi imunoadhezini, vežejo topno, pa tudi transmembransko obliko liganda, na ta način preprečujejo njegovo interakcijo z receptorjem na površini celic in s tem njegovo biološko aktivnost (21). V obliki fuzijskih proteinov s fragmentom Fc so na trgu že prisotne zunajcelične domene receptorja za dejavnik tumorske nekroze α (TNFR II; etanercept), z limfocitno funkcijo povezan antigen 3 (LFA-3; alefacept) in s citotoksičnim limfocitom T povezano molekulo 4 (CTLA-4; abatacept). Tovrstne učinkovine uporabljamo za zdravljenje različnih oblik artritisa in psoriaze (20).

Za biološko aktivnost nekaterih citokinov, kot so interleukin (IL)-1, IL-4, IL-6 in IL-13, je potrebna interakcija liganda z več komponentami receptorskega sistema. Monomerni topni receptorji tako izkazujejo premajhno afiniteto do tovrstnih ligandov in so neučinkoviti vezalci imenovanih citokinov. Fuzijski protein, sestavljen iz fragmenta Fc in zunajceličnih domen dveh med seboj oddaljenih komponent citokinskega receptorskega sistema, udeleženi pri interakciji s citokinom, izraža visoko afiniteto do izbranega liganda

(slika 3b). Citokin se »ujame v past« med domeni receptorja, iz česar izhaja imenovanje tovrstnih učinkovin kot »citokinske pasti«. Na ta način je preprečena vezava liganda na receptorski sistem na površini celic in njegova biološka aktivnost (22). Primer tovrstne učinkovine na trgu je antagonist IL-1, fuzijski protein, sestavljen iz regij receptorja za IL-1 tipa I (IL-1RI) in koreceptorja za IL-1 (ang. IL1 receptor accessory protein, IL-1RAcP) ter fragmenta Fc IgG₁, imenovan riloncept. Uporabljamo ga za zdravljenje redke skupine avtoimunskih vnetnih boleznih imenovanih s kriopirinom povezani periodični sindromi (20).

Proteolitična razgradnja in velik očistek peptidov iz organizma omejujeta terapevtsko uporabo peptidnih učinkovin. *In vivo* stabilnost je peptidu mogoče izboljšati s pripravo t.i. »peptitelesa« (ang. peptibody), fuzijskega proteina peptida in regije Fc IgG (slika 3d) (23). Primer peptitelesa na trgu je romiplostim, fuzijski protein peptidnega mimetika trombopoetina in regije Fc. Deluje kot agonist na trombopoetinskem receptorju in se uporablja za zdravljenje kronične trombocitopenične purpore. V prihodnje veliko obeta priprava fuzijskih proteinov regije Fc in peptida s tehnologijo MIMETIBODY™ (20).

FcRn ima poleg uravnavanja biološke razpolovne dobe protitelesa še eno pomembno funkcijo. Izražen na placenti omogoča transport IgG iz matere v zarodek in s tem imunost novorojenčka. Pri odraslem človeku omenjeni receptor najdemo na absorptivnih epiteljskih tkivih pljuč, ledvic in črevesja, kjer omogoča prehajanje IgG (18). Konjugacija terapevtskih proteinov z regijo Fc IgG, poleg povečanja biološke razpolovne dobe učinkovine, omogoča transport proteinov, kot so folikle stimulirajoči hormon (FSH), eritropoetin, dejavnik strjevanja krvi IX in interferona α ter β , preko epiteljske bariere pljuč in s tem vnos biološko aktivnega proteina v organizem na neinvaziven način. Poznamo heterodimerno obliko fuzijskega proteina (slika 3e), kjer sta na regijo Fc pripeti dve različni proteinski molekuli, in monomerni (slika 3c) ter dimerni fuzijski protein, kjer je na fragment Fc pripeta le ena oz. dve enaki proteinski molekuli. Učinkovitejšo sistemsko dostavo učinkovine prek pljuč omogočajo manjši monomerni fuzijski proteini (24).

1.3 Izolacija in čiščenje terapevtskih monoklonskih protiteles

1.3.1 Zaključni procesi pri proizvodnji monoklonskih protiteles

Za proizvodnjo terapevtskih mišjih mAb uporabljamo hibridomske celične linije, za pridobivanje rekombinantnih oblik mAb pa so največkrat v uporabi sesalske celice (ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO) in mišje limfoidne celice). Veliko obeta proizvodnja proteinov v genetsko spremenjenih živalih in rastlinah. Bakterijski ekspresijski sistemi *E. coli* so primernejši za pridobivanje fragmentov protiteles (25). Rekombinantna mAb celice izločajo v gojišče, iz kompleksne biološke zmesi pa moramo zeleno učinkovino izolirati in očistiti. Terapevtska mAb v telo vnašamo parenteralno, zato je zahtevana končna čistota zanje >99 % (26). Zaključni procesi predstavljajo 50-80 % vseh stroškov v proizvodnji mAb (25), zato je učinkovit, zanesljiv, ponovljiv in ekonomičen proces izolacije in čiščenja, ki omogoča pridobivanje ustrezno čiste učinkovine, v proizvodnji terapevtskih mAb ključnega pomena (26).

Prvi korak v okviru čiščenja in izolacije v proizvodnji mAb je ločitev celic in celičnih ostankov od procesne tekočine s centrifugiranjem ali mikrofiltracijo. Najbolj razširjena je uporaba centrifuge z diski. Procesno tekočino nadalje vodimo preko globinskih filtrov in membranskih filtrov z definirano velikostjo por. S postopki t.i. »žetve« izoliramo mAb v obliki bistrega gojišča (27).

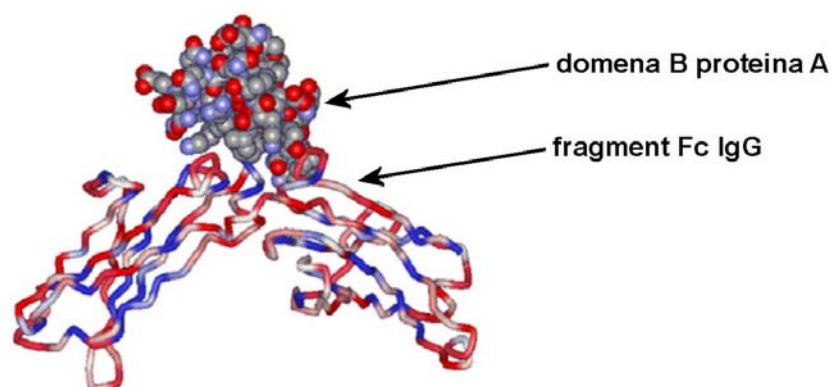
Ključna stopnja v okviru zaključnih procesov pri proizvodnji mAb je uporaba afinitetne kromatografije na protein A (AKA), ki hkrati omogoča čiščenje in koncentriranje produkta. Metoda izkorišča specifično interakcijo med proteinom A, imobiliziranim na inertnem nosilcu, in regijo Fc protitelesa, ki ga želimo izolirati. Na kolono nanašamo bistro procesno tekočino pri nevtralnem pH, elucija vezanega produkta poteka s pomočjo kislih raztopin. Ostale komponente se na kolono ne vežejo in jih speremo s pufrji vmesnih pH. Sledi regeneracija kolone s visokimi koncentracijami kaotropnih snovi, kot sta urea in gvanidinijev klorid. Metoda je visoko selektivna za mAb, zagotavlja kar 99,9 % čistoto učinkovine (27).

Pri proizvodnji mAb v sesalskih celičnih ekspresijskih sistemih je možna kontaminacija učinkovine z virusi. Morebitne viruse inaktiviramo z inkubacijo eluata pri nizkem pH (27, 28). Nadalje s kromatografskimi metodami odstranimo preostale nečistote,

kot so proteini in DNA gostiteljskih celic, skupke in fragmente protiteles ter morebitni protein A. Običajno izbiramo med kationsko in anionsko izmenjevalno kromatografijo, hidrofobno kromatografijo in kromatografijo, kjer kot ligand uporabimo hidroksiapatit. Največkrat uporabimo dve izmed naštetih metod (27). Poslužujemo se lahko tudi gelske filtracije (29). Včasih je potrebno odstraniti nepravilno zvite in neaktivne molekule produkta (27). Z ustrezno izbiro kromatografske metode je mogoče delno odstraniti tudi viruse (27, 28). Poleg obdelave eluata z nizkim pH se za dokončno odstranitev virusov poslužujemo postopka filtracije. Virusni filtraciji sledi ultrafiltracija ali diafiltracija, s pomočjo katere dosežemo visoko koncentracijo protitelesa v formulacijskem pufu (27).

1.3.2 Afinitetna kromatografija na protein A

Protein A je komponenta celične stene bakterije *Staphylococcus aureus*. Sestavlja ga pet domen A, B, C, D in E, ki so vsaka zase sposobne interakcije z vezavnim mestom na IgG med področjema C_{H2} in C_{H3} fragmenta Fc (slika 4, slika 5), in regija, preko katere je pripet na celično steno bakterije (30). Primarne strukture domen so si v 65-90 % enake (31). Rekombinantni protein A lahko v velikih količinah pridobivamo v bakterijskem ekspresijskem sistemu (32). Izraža visoko afiniteto do regije Fc IgG₁, IgG₂ in IgG₄ ($K_a=10^8 \text{ M}^{-1}$) (30). Je relativno stabilen v širokem območju vrednosti pH (pH 2-11), po obdelavi kolone s kaotropnimi raztopinami je sposoben ponovno zavzeti nativno konformacijo.



Slika 4: Interakcija med fragmentom Fc IgG in domeno B proteina A (prirejeno po 29).

Imobilizacijo proteina A na inerten nosilec lahko dosežemo na več načinov in ni zahtevna, vezan ligand pa ohranja sposobnost vezave protitelesa (32). Uporabnik lahko

izbira med različnimi vrstami nosilcev z vezanim ligandom z različnimi lastnostmi, visokih vezavnih kapacitet (30). Komercialno so dostopne s stacionarno fazo pakirane kolone različnih velikosti in komplet opreme za čiščenje, sestavljen iz nosilca z vezanim ligandom in ustreznih pufrov (32).



Slika 5: Aminokislinska zaporedja domen proteina A in rekombinantno pripravljene domene Z. * označuje enako AK kot je v domeni B, uokvirjene so AK, ki tvorijo tri antiparalelne α -vijačnice, znotraj njih so rdeče označene AK, odgovorne za vezavo regije Fc IgG (prirejeno po 33).

AKA ima pri čiščenju mAb v industrijskem merilu več slabosti. Izolacija proteina A iz bakterijske kulture ostaja kompleksna in draga (32). Cena nosilcev z vezanim proteinom A presega 35 % celotnih stroškov v zaključnih procesih proizvodnje mAb (34). Čiščenje mAb iz supernatanta kulture celic CHO s pomočjo treh kromatografskih metod brez AKA se je izkazalo za enako učinkovito, a cenejše kot čiščenje z uporabo AKA, s sledečima kationsko in anionsko izmenjevalno kromatografijo (34).

Ker protein A pridobivamo v bakterijah, je potrebno med zaključne procese pri proizvodnji mAb vpeljati tudi postopek za preverjanje in zagotavljanje odsotnosti nevarnih kontaminantov, kot so pirogeni (32). Morebitno uhajanje imunogenega proteina A iz kolone se odraža v pojavu nove nečistote v procesni tekočini, ki pa jo običajno odstranimo v sledečih korakih čiščenja (28).

AKA zagotavlja visoko stopnjo čistote poli- in monoklonskih IgG človeka in večine laboratorijskih živali, z izjemo humanega IgG₃ in mišjega IgG₁. Interakcija z IgM in IgA je šibka, IgD protein A ne veže (32). Protein A interagira tudi z regijo Fab IgG. Ker so vezavna mesta za fragment Fc na proteinu A ločena od vezavnih mest za regijo Fab, je mogoča eliminacija slednjih in priprava derivata proteina A z izboljšano specifičnostjo (30, 31).

Največji problem metode so ostri pogoji, potrebni za elucijo vezanega produkta. Čeprav naj bi glavno vlogo pri disociaciji kompleksa proteina A in IgG imela ionizacija histidina na mestu 310 pri pH 5, elucija vezanih protiteles ni mogoča s pufri s pH nad 4

(31). Izpostavitvev kislim pogojem se lahko odraža v spremembi konformacije (35), zmanjšani stabilnosti in ireverzibilni inaktivaciji mAb (31, 36) ter nastanku topnih agregatov in/ali netopnih precipitativ produkta (27). V primeru agregacije visokega deleža proteina je donos produkta zmanjšan, precipitati skrajšujejo čas uporabnosti kolone (27). Z genetsko manipulacijo domene B in domene Z, rekombinantne mutante domene B, so pripravili analoge proteina A, ki izkazujejo nižjo afiniteto do Ig, in na ta način omogočili elucijo produkta pod milejšimi pogoji (37, 38). Zmanjšanje agregacije in precipitacije med elucijo proteina iz kolone so dosegli z izbiro ustreznih pufrov za spiranje in elucijo, dodatkom stabilizatorjev v elucijski pufer, predhodno uporabo ustreznih globinskih filtrov in uporabo nižje temperature v koraku AKA (27).

Ponavljajoča izpostavljenost alkalnim raztopinam (1M NaOH), ki jih uporabljamo pri čiščenju opreme, manjša stabilnost nosilcev s proteinom A. Zamenjava asparagina s treoninom na mestu 23 znotraj aminokislinskega zaporedja domene Z se odraža v zmanjšani verjetnosti deamidacije liganda pri bazičnih pogojih in posledično podaljšanju časa uporabnosti nosilca, medtem ko ligand ohranja sposobnost vezave IgG (39). Tehnologija rekombinantne DNA omogoča pripravo t.i. »afiteles« (ang. affibodies), palete proteinov z afiniteto do različnih tarčnih molekul. Njihova sekundarna struktura je podobna strukturi izhodne domene Z, poznamo tudi afitelo, specifično za human IgA (40).

1.3.3 Alternative proteinu A za uporabo v afinitetni kromatografiji

1.3.3.1 Bioafinitetni ligandi

Poleg proteina A poznamo več bakterijskih proteinov, ki vežejo Ig (preglednica I), med njimi sta najpomembnejša proteina G in L. Vsi so virulenčni faktorji, saj patogenom omogočajo izogibanje opsonizaciji in s tem fagocitozi gostiteljevega imunskega sistema (32). Protein G sestavljajo tri visoko homologne domene, ki so sposobne vezave IgG. Proteina G in A kljub zelo različni aminokislinski zgradbi interagirata z vezavnima mestoma na fragmentu Fc IgG, ki se močno prekrivata (41). Za kompleks proteina A in fragmenta Fc so značilne predvsem hidrofobne interakcije, manj je polarnih interakcij, medtem ko kompleks proteina G in regije Fc stabilizirajo predvsem polarne interakcije (31, 41).

Preglednica I: Bakterijski proteini z afiniteto do Ig (28).

Protein	Vir	Vezava Ig
protein A	<i>Staphylococcus aureus</i>	močna vezava regije Fc IgG
protein G	skupini C in G streptococci	močna vezava regije Fc IgG
protein L	<i>Peptococcus magnus</i>	vezava lahkih verig κ
protein P	<i>Clostridium perfringens</i>	vezava lahkih verig κ
protein D	<i>Branhamella catarrhalis</i>	IgD, šibka vezava IgG
protein B	skupina A streptococci	IgA, šibka vezava IgG

Protein G izraža afiniteto ($K_a=10^8-10^{10} \text{ M}^{-1}$) do IgG različnih vrst sesalcev, tudi do mišjega IgG₁ in humanega IgG₃, ki ju z AKA ne moremo očistiti. IgM, IgA in IgD ligand ne veže (31). Protein G interagira z albuminom, α 2-makroglobulinom in kinogenom, kar je vodilo do kontaminacije produkta po AKG, zato so pripravili rekombinantno obliko liganda, ki neželenih vezavnih mest ne vsebuje (28, 32). Tudi protein G veže fragment Fab (41). Kapaciteta nosilcev s proteinom G je značilno manjša v primerjavi z nosilci s proteinom A (28). Pripravili so pri bazičnih pogojih stabilnejše analoge proteina G (42).

Protein L izraža visoko afiniteto do lahkih verig protitelesa κ_1 , κ_3 in κ_4 , vendar ne do κ_2 in λ (43). Interagira s številnimi Ig kot tudi s fragmenti protiteles, ki regije Fc ne vsebujejo, kot sta scFv in Fab, ter je primeren ligand zlasti za afinitetno čiščenje slednjih (31). V afinitetni kromatografiji uporabljamo tudi rekombinantne oblike ligandov, pripravljene iz domen proteinov A in G ter proteinov G in L, sposobnih vezave Ig (44, 45). Na trgu najdemo rekombinantne oblike proteinov A, G in A/G z dodano heksahistidinsko oznako, ki olajša čiščenje proteina iz bakterijske kulture, ali z dodanim cisteinom, ki olajša imobilizacijo liganda na nosilec (31).

V splošnem proteinski ligandi izražajo visoko afiniteto do IgG, a je njihova uporaba, tako kot uporaba proteina A, povezana z visokimi stroški, težavami pri izolaciji in čiščenju iz kulture bakterijskih celic, možnostjo prisotnosti nevarnih kontaminantov, ostrimi pogoji, ki so potrebni za elucijo produkta, nestabilnostjo liganda v postopku čiščenja opreme in možnostjo odpuščanja imunogenih molekul proteinov A, G, L in A/G z nosilca (25).

Anti-IgG variabilni fragment (težke verige) kameljih ali laminih protiteles VHH je visoko selektiven ligand za afinitetno čiščenje IgG, stabilen ob izpostavitvi ostrim alkalnim pogojem. Ker so molekule VHH monomeri, niso sposobni vezave večjega števila IgG, kar zmanjšuje kapaciteto tovrstnih nosilcev (28). Ig so glikoproteini, zato je njihovo čiščenje

mogoče tudi z uporabo afinitetne kromatografije z imobiliziranimi lektini. Ta način uporabljamo predvsem za izolacijo IgA. Prednost metode je v možnosti izvedbe vseh korakov pri nevtralnem pH, vendar v splošnem njena uporaba zaenkrat prinaša več težav kot pa jih rešuje (29, 32).

1.3.3.2 Sintezni peptidni ligandi

Visokozmogljive tehnike presejanja knjižnic peptidov predstavljajo učinkovito orodje za iskanje manjših peptidnih molekul kot alternativnih ligandov proteinu A. V splošnem so peptidni ligandi cenejši, proteolitično stabilnejši in manj toksični ter imunogeni v primerjavi s proteinskimi, obstojni pri pogojih sterilizacije, izražajo nižjo afiniteto do Ig in zato omogočajo elucijo produkta pod milejšimi pogoji (31).

Mimetik proteina A (PAM) TG19318 je tetramerni tripeptid (R-T-Y)₄-K₂-K-G, ki je bil kot ligand uporabljen za izolacijo človeških in različnih živalskih poli- in monoklonskih Ig različnih razredov (46). Ligand D-PAM, ki ga sestavljajo aminokislina v D konfiguraciji, ohranja afiniteto do IgG, a je v primerjavi s PAM odpornejši na razgradnjo s proteazami (47). Poleg PAM je bil kot mimetik proteina A identificiran linearni peptid EPIHRSTLTALL, ki interagira s konstantno regijo humaniziranega IgG₁ mAb proti podenoti p55 receptorja za IL-2 (HAT). Omenjen peptid je v 42 % homologen z določenim segmentom proteina A (48). Streptokokni IgA vezavni peptid je bil uspešno uporabljen za afinitetno čiščenje IgA. Sintezni peptid, sestavljen iz 50 aminokislin, vsebuje 29 aminokislin, ki so odgovorne za interakcijo proteina M vrste *Streptococcus pyogenes* z IgA (49).

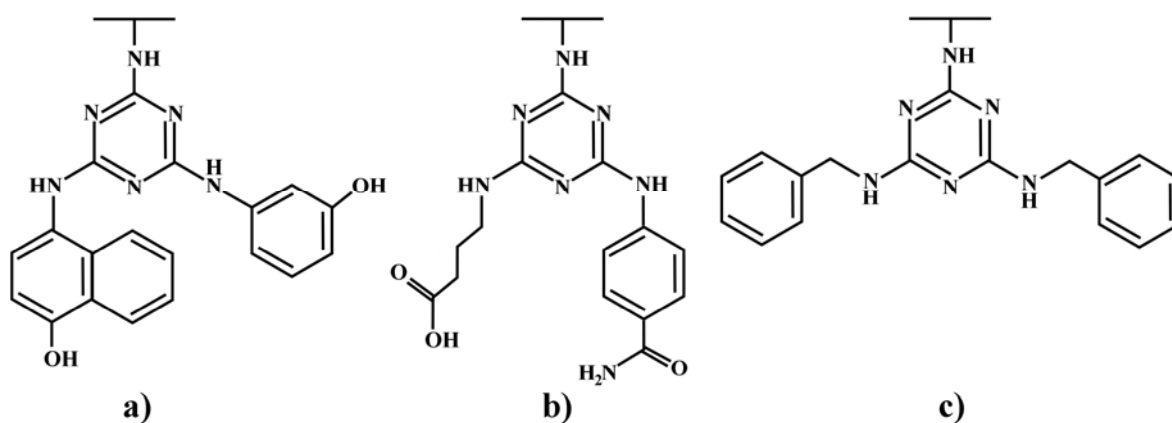
Tetrapeptid APAR (50) in peptid, sestavljen iz 22 AK (51), izražata afiniteto do vezavnega mesta za antigen mAb proti granulocitne/makrofagne kolonije stimulirajočemu dejavniku (GM-CSF) oz. mAb proti tenascin-C in sta zato zelo specifična liganda za afinitetno čiščenje omenjenih mAb. Za izolacijo mAb sta bili uporabljeni tudi epitopna in mimotopna afinitetna kromatografija. Linearna epitop PDTRPAP (52) in mimotop GLFYD (53) sta bila uporabljena kot liganda za afinitetno čiščenje mAb proti MUC1 mucinu (C595) oz. mišjega IgG₁ proti estriol-3-glukuronidu.

Z afinitetno selekcijo je bil iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice izbran ciklični peptid, sestavljen iz 13 aminokislin, imenovan Fc-III. Izkazuje visoko afiniteto do fragmenta Fc IgG, v interakciji z njim močno posnema protein A (54). Do regije Fc izkazujejo afiniteto tudi trije linearni dekapeptidi (55) in trije linearni heksapeptidi, med slednjimi se je kot najprimernejši kandidat za afinitetno čiščenje IgG izkazal peptid HWRGWV (56). S pomočjo molekulskega sidranja so našli ligand N-benziloksikarbonil-L-tirozin, ki interagira s fragmentom Fc in omogoča izolacijo humanega IgG iz krvne plazme (31). Tudi ciklični peptid (C-F-H-H)₂-K-G, imenovan peptid H, je bil kot ligand v afinitetni koloni uporabljen za čiščenje mišjih IgG (57).

1.3.3.3 Sintezni nepeptidni ligandi

Peptidni ligandi odpravljajo nekatere pomanjkljivosti proteinov A, G in L, a problem ostaja v občutljivosti peptidnih vezi. Morebitno rešitev predstavljajo majhne nepeptidne molekule, kot so histamin in histidin (28, 32), diklorpiridin (25), kovinski ioni Ni²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ in Co²⁺ ter tiofilni geli (29, 32), kristali hidroksiapatita in adsorbenti, po strukturi (hetero)aromatski sistemi s pripetimi različnimi hidrofilnimi skupinami (t.i. »mixed-mode« ligandi) (29). Naštete ligande odlikujejo nizki stroški pridobivanja, kemijska stabilnost in obstojnost pri pogojih sterilizacije ter majhna toksičnost in imunogenost. Afiniteta tovrstnih ligandov je običajno nižja v primerjavi s proteinoma A in G, a naj bi bila pri izbranih pogojih zadostna za selektivno prepoznavo Ig (29).

Možnost določanja kristalne strukture proteinov in proteinskih kompleksov ter računalniško podprte tehnike molekulskega modeliranja so omogočile racionalno načrtovanje in sintezo majhnih nepeptidnih ter posledično stabilnih molekul, ki posnemajo delovanje biološko aktivnih proteinov. Ligand 22/8 posnema dipeptid Phe-132:Tyr-133, ki je ključni motiv domene B proteina A pri tvorbi kompleksa z regijo Fc IgG. Sestavljata ga dva organska aromatska amina, med seboj povezana preko triazinskega obroča (slika 6a). Ligand se je izkazal kot učinkovit vezalec humanih IgG, IgM in IgA ter IgG različnih živalskih vrst (46, 58). Koncept racionalnega načrtovanja je bil uporabljen tudi pri sintezi mimetika proteina L. Triazinski derivat, označen kot molekula 8/7 (slika 6b), se je izkazal kot potencialni ligand za izolacijo Ig in fragmentov Fab s pomočjo afinitetne kromatografije (59). Potencialno alternativo proteinu A predstavlja tudi ligand 11/11, prav tako derivat triazina (slika 6c), načrtovan kot vezalec sladkorne verige glikoproteinov (29, 60).



Slika 6: Sintezni ligandi IgG: (a) 22/8 (2-(3-aminofenol)-6-(4-amino-1-naftol)-4-kloro-[1,3,5]triazine), (b) 8/7 (4-{4-(4-karbamoilfenilamino)-6-kloro-[1,3,5]triazin-2-amino}butanojska kislina) in (c) 11/11 (2,4-dibenzil-6-kloro-[1,3,5]triazin) preko klora na mestu 4 oz. 6 imobilizirani na trden nosilec (prirejeno po 58, 59, 60).

Nekatere izmed omenjenih sinteznih peptidnih in nepeptidnih molekul so dostopne na trgu kot alternativa uporabi proteina A: tiofilni ligand 4-merkaptetilpiridin, tržen pod imenom MEP HyperCel[®]; peptidni mimetik proteina A Kaptiv-GY[®], izpeljan iz molekule TG19318; MAbSorbent[®] A2P, izpeljan iz triazinskega liganda 22/8; t.i. »mixed-mode« ligand FastMabsA[®] in anti-IgG fragment kameljih protiteles VHH CaptureSelect[®] (28, 31).

1.3.4 Čiščenje monoklonskih protiteles v prihodnje

Zaradi potencialnega mašenja kolone s sestavinami kompleksnih bioloških zmesi, zahteva uporaba klasične afinitetne kromatografije predhodno centrifugiranje ali filtriranje bioprocesne brozge, kar je v današnjem času, ko težimo k razvoju časovno in denarno ekonomičnih procesov, torej procesov s čim manj koraki, nezaželeno (32). Veliko obetata afinitetna kromatografija s t.i. razširjeno fluidizirano stacionarno fazo (ang. expanded-bed affinity chromatography) (28) in monolitna kromatografija (61), ki se dokazujeta kot učinkoviti metodi za čiščenje mAb neposredno iz suspenzij celičnih kultur.

Optimiranje procesa izolacije in čiščenja mAb lahko poteka že na genski ravni. Genu, ki nosi zapis za želeno protitelo, dodamo nukleotidno zaporedje, ki se izraža kot visoko selektivna oznaka, kar olajša čiščenje mAb z afinitetno kromatografijo. Kot oznako bi lahko uporabili heksahistidin ali glutation S transferazo (28). Genu, ki kodira želeno protitelo, bi lahko dodali tudi nukleotidno zaporedje, ki bi se na C-koncu proteina izražalo kot zaporedje aminokislin, primerno za encimsko pripenjanje biotina, biotinilirano

protitelo pa bi lahko iz kompleksne zmesi izolirali s pomočjo specifične in visoko afinitetne interakcije biotina z avidinom oz. streptavidinom (62). Dodano oznako je potrebno po kromatografskem čiščenju proteina s specifično reakcijo cepitve odstraniti, kar zahteva dodaten korak čiščenja. Težavno je doseganje mestospecifične cepitve proteina in kasnejše odstranjevanje proteaz. Kot oznako bi lahko uporabili derivat inteina, kar bi korak cepitve proteina močno poenostavilo (28). Intein, imenovan tudi "proteinski intron", je namreč samoizrezovanja sposoben segment proteina.

V prihodnje se kot alternativa obstoječemu vzorcu izolacije in čiščenja mAb obeta uporaba nekromatografskih metod iz živilske industrije in proizvodnje industrijskih encimov, kot so tehnologija visoko gradientne magnetne ločitve, t. i. membranska kromatografija, uporaba nabitih membran, afinitetna ultrafiltracija in precipitacija, flokulacija, kristalizacija in uporaba dvofaznih vodnih sistemov. Zanimiv pristop predstavlja uporaba oljnih teles, ki na membranah izražajo fuzijske proteine proteina A s transmembranskim proteinom oleozinom, kar omogoča enostavno izolacijo kompleksov oljnih teles z mAb s centrifugiranjem (28, 29).

1.4 Predstavitev na bakteriofagu

Predstavitev (poli)peptidov in proteinov na površini bakterijskih virusov je leta 1985 kot prvi opisal Smith (63). Danes metoda v kombinaciji z *in vitro* tehniko selekcije predstavlja učinkovito orodje za iskanje ligandov izbrani tarči (64, 65).

V strukturni gen nitastih (M13, fd in f1) ali litičnih (T7, T4 in λ) bakteriofagov lahko vstavimo nukleotidno zaporedje, ki nosi zapis za določen peptid. Kot inserte uporabimo naključne oligonukleotide in na ta način dobimo raznoliko populacijo rekombinantnih virusnih delcev, ki na svoji površini izražajo naključne peptide v obliki fuzijskih proteinov s plaščnim proteinom faga (slika 7). Povezava fagnega genotipa s fenotipom omogoča enostavno pomnoževanje izbranega klona virusnega delca za podrobnejšo karakterizacijo (64, 66).



Slika 7: Linearni (a) oz. ciklični (b) heptapeptid iz knjižnice Ph.D.-7TM oz. Ph.D.-C7CTM: a) zaporedje sedmih naključnih AK (X) je preko kratkega distančnika (Gly-Gly-Gly-Ser) pripeto na N-konec naravnega zaporedja proteina pIII; b) na N-koncu površinskega proteina se nahaja alanin, proti C-koncu mu sledijo cistein, sedem naključnih AK (X), cistein, distančnik (Gly-Gly-Gly-Ser) in aminokislinsko zaporedje proteina pIII (67).

V postopku afinitetne selekcije kombinatorično bakteriofagno peptidnopredstavitevno knjižnico inkubiramo z imobilizirano tarčno makromolekulo in nevezane virusne delce speremo. Sledi elucija vezanih klonov, pri čemer lahko prekinitev interakcije tarče z vezanimi fagi dosežemo na specifičen ali nespecifičen način. Doseči želimo obogatitev do tarče visokoafinitetnih virusnih klonov, zato eluirane fage pomnožimo v bakterijski kulturi in pomnožen eluat v naslednji selekcijski stopnji tretiramo pod ostrejšimi pogoji. Po 3-5 selekcijskih ciklih izbrane klone ovrednotimo s testom ELISA in jim določimo nukleotidno zaporedja inserta, ki nosi zapis za površinsko predstavljen peptid. Na ta način identificiramo aminokislinsko zaporedje oz. znotraj njega motiv, odgovoren za interakcijo faga s tarčnim proteinom (64, 67).

Pri eksperimentalnem delu smo peptidne ligande regije Fc humanega IgG iskali s pomočjo afinitetne selekcije knjižnic cikličnih in linearnih heptapeptidov Ph.D.-C7CTM ter Ph.D.-7TM (slika 7). Naključni heptapeptidi obeh uporabljenih knjižnic so predstavljeni na vseh petih kopijah kapsidnega proteina pIII nitastega bakteriofaga M13 (67). V primeru vezave večvalentnega liganda, je interakcija izbranega fagnega klona s tarčno molekulo močno ojačana. Sintezni peptid, po aminokislinskem zaporedju enak na fagu predstavljenem peptidu, lahko zaradi izgube učinka avidnosti dejansko kaže precej manjšo afiniteto do tarčnega proteina, zato kot ligand v afinitetni kromatografiji za izolacijo mAb iz bioprocenjske tekočine ne bi bil primeren. V takem primeru omogoča ločbo monolitna afinitetna kromatografija (zaradi omejene kapacitete nosilcev sicer zgolj v analizne namene), kjer velikost por monolitnih gelov dopušča vezavo relativno velikih fagnih delcev, ki izražajo za tarčo specifične peptide, kot ligandov za čiščenje proteinov iz kompleksnih bioloških zmesi (68, 69).

Za peptide iz knjižnice Ph.D.-C7CTM je značilno, da se na obeh koncih naključnega zaporedja sedmih aminokislin nahajata cisteinska ostanka, ki pri šibko oksidirajočih pogojih periplazme *E. coli* tvorita disulfidno vez (slika 7). Zaradi ciklične narave so ti peptidi sposobni zavzeti manjše število konformacij, zato je verjetnost, da najdemo klon s predstavljenimi peptidi, ki bi se prostorsko ujemali in bili tako sposobni interakcije z vezavnimi mesti tarčne molekule, manjša v primerjavi z verjetnostjo, da najdemo ustrezne klone iz knjižnice linearnih heptapeptidov, ki vsebuje fage s fleksibilnimi peptidnimi verigami. Če pa bi med možnimi konformacijami cikličnega peptida obstajala takšna, ki bi bila prostorsko komplementarna vezavnemu mestu na tarčni makromolekuli, bi bila interakcija cikličnega peptida s tarčo, v primerjavi z linearnim peptidom enakega aminokislinskega zaporedja, termodinamsko ugodnejša, saj bi bilo zmanjšanje konformacijske entropije ob vezavi cikličnega peptida manjše. V tem primeru bi torej iz knjižnice izolirali fage s predstavljenimi cikličnimi peptidi, katerih afiniteta in specifičnost do tarče bi bila večja v primerjavi s kloni z ustrežajočimi linearnimi peptidi. Poleg tega bi bil ciklični peptid, v primerjavi z linearnim peptidom enakega aminokislinskega zaporedja, najverjetneje proteolitično obstojnejši, kar je močno zaželena lastnost liganda, uporabljenega pri čiščenju mAb z afinitetno kromatografijo.

2 NAMEN NALOGE

Monoklonska protitelesa in fuzijski proteini z regijo Fc humanega IgG predstavljajo eno najpomembnejših skupin bioloških učinkovin. Za njihovo izolacijo iz gojišč največkrat uporabljamo afinitetno kromatografijo na protein A. Protein A ima kot ligand številne slabosti. Njegova uporaba je povezana s težavami že pri sami proizvodnji rekombinantne oblike liganda, visokimi stroški, možnostjo prisotnosti nevarnih kontaminantov in odpuščanja imunogenih molekul proteina A z nosilca, nestabilnostjo liganda v postopku čiščenja opreme in ostrimi pogoji, ki so potrebni za elucijo produkta iz kolone. Alternativno predstavljajo sintezni (peptidni) ligandi, ki so proteolitično obstojnejši, cenejši in manj imunogeni, njihova priprava je enostavnejša, izražajo nižjo afiniteto do Ig in zato omogočajo elucijo produkta pod milejšimi pogoji.

Liganda, ki bi bil po svoji specifičnosti do regije Fc IgG primerljiv s proteinom A, še niso našli, kljub temu so nekatere izmed sinteznih peptidnih in nepeptidnih molekul dostopne na trgu kot alternativa uporabi proteina A (1.3.3.3). Izmed vseh je glede specifičnosti proteinu A še najbližje anti-IgG fragment VHH, domnevno zaradi svoje kompleksnejše strukture (28). V industrijskih in akademskih krogih tako ostaja izziv v iskanju novih ligandov, ki bi bili uporabni za afinitetno čiščenje monoklonskih protiteles, s tem izzivom pa se bomo spoprijeli tudi mi.

Z afinitetno selekcijo iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic naključnih cikličnih in linearnih heptapeptidov bomo skušali poiskati ligande humane regije Fc. Interakcijo izbranih rekombinantnih bakteriofagov s tarčnim proteinom bomo ovrednotili z nizom prirejenih encimskoimunskih testov na trdnem nosilcu (ELISA). Fagnim klonom z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo vezave regije Fc bomo določili nukleotidna zaporedja insertov in njim ustrezajoča aminokislinska zaporedja predstavljenih peptidov. Slednje bomo med seboj primerjali in znotraj njih iskali skupni motiv, ki bi bil odgovoren za selektivno vezavo fagov na regijo Fc humanega IgG. Pripravili bomo sintezni peptid, ki ustreza izbranemu zaporedju, izoliranemu v presejanju bakteriofagne predstavitvene knjižnice, in preverili, ali kljub izgubi učinka avidnosti ohranja afiniteto do tarčnega proteina.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
agaroza	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
blokirno sredstvo ECL Advance™	GE Healthcare, Piscataway, NJ, ZDA
citronska kislina monohidrat (C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Nemčija
DMF (dimetilformamid)	Merck, Darmstadt, Nemčija
EDTANa ₂ · 2H ₂ O (dinatrijeva sol etilendiamintetraocetne kisline dihidrat, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ · Na ₂ · 2H ₂ O)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Nemčija
etanol, 96 %	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
glicerol	Fluka Chemie, Buchs, Švica
glicin	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
HCl, 37 %	Merck, Darmstadt, Nemčija
H ₂ SO ₄ , 95-97 %	Merck, Darmstadt, Nemčija
IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, WI, ZDA
KCl	Merck, Darmstadt, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Nizozemska
kvasni ekstrakt Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, ZDA
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Fluka Chemie, Buchs, Švica
NaCl	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Španija
NaOH	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
NaI	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
pepton Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, ZDA

polietilenglikol 8000 (PEG 8000)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija
kemiluminiscenten substrat Super Signal [®] West Dura Extended Duration Substrate (Stable Peroxide Buffer, Luminol/Enhancer Solution)	Thermo Scientific, Rockford, ZDA
Tris (tris(hidroksimetil)aminometan)	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
urea	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA

Vse uporabljene kemikalije so bile *p.a.* čistote.

3.1.2 Biološki material

Bakteriofagni peptidopredstavitveni knjižnici	Proizvajalec
Ph.D.-7 TM in Ph.D.-C7C TM	
Obe knjižnici sta suspenziji bakteriofagov v zmesi pufru TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) in glicerola (50 % (v/v)), hranjeni pri -20 °C, z raznolikostjo $1,2 \cdot 10^9$ pfu (Ph.D.-C7C TM) oz. $2,8 \cdot 10^9$ pfu (Ph.D.-7 TM) in titrom $2 \cdot 10^{13}$ pfu/mL.	New England Biolabs, ZDA
Proteini in peptidi	Proizvajalec
fragment Fc humanega IgG	
Protein je bil pridobljen s proteolitično razgradnjo IgG, izoliranih iz seruma človeka, s papainom (70). Raztopino proteina v fosfatnem pufru, s koncentracijo 2,3 g/L smo hranili pri 4 °C.	Jackson ImmunoResearch Europe, Ltd, Suffolk, Velika Britanija
protein A in protein G; liofilizata	
Liofiliziran protein A oz. G smo raztopili v pufru PBS (koncentracija 1 g/L) in shranili pri -80 °C.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
streptavidin; liofilizat	
Liofiliziran streptavidin smo raztopili v pufru PBS (koncentracija 1 g/L) in shranili pri -20 °C.	New England Biolabs, ZDA

mAb proti bakteriofagu M13, konjugirano s hrenovo peroksidazo (anti-M13-mAb-HRP)	Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, ZDA
Konjugat v glicerolu in pufu PBS (50 % (v/v)) smo hranili pri -20 °C.	
goveji serumski albumin (BSA); liofilizat, hranjen pri 4 °C	Sigma, St. Louis, ZDA
Dynabeads [®] MyOne [™] Streptavidin T1	
Suspenzijo superparamagnetnih kroglic s kovalentno pripetim streptavidinom v obliki monosloja, koncentracije 10 mg (7-12 · 10 ⁸ kroglic)/mL in kapacitete ~ 400 pmol biotiniziranih peptidov/mg kroglic smo hranili pri 4 °C.	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norveška
kozje protitelo proti humani regiji Fc IgG, konjugirano s hrenovo peroksidazo (anti-Fc hlgG-HRP)	Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, ZDA
Konjugat smo v raztopini 10 mM Na ₃ PO ₄ , 150 mM NaCl, 1 % BSA in 0,01 % tiomersala, pri pH 7,2, hranili pri 4 °C.	
infliksimab (Remicade [®]); liofilizat	
Raztopino terapevtskega mAb s koncentracijo 10 g/L v pufu PBS nam je podaril Miha Kosmač iz Zavoda za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Hranili smo jo pri -20 °C.	Centocor Ortho Biotech Inc, Malvern, PA, ZDA
papain; liofilizat	
Raztopino papaina s koncentracijo 60 mg/L v 50 mM fosfatnem pufu s pH 6,8, ob dodatku 1 mM EDTA, smo hranili pri -20 °C.	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
mišje mAb proti humanemu leptinu; liofilizat	
Liofilizirano mAb smo raztopili v pufu PBS (koncentracija 410 mg/L) in shranili pri -80 °C.	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
peptid p3n; liofilizat	
Liofiliziran biotiniziran peptid p3n, z aminokislinskim zaporedjem HKVTSYLGGG(Bio-Lys)-NH ₂ smo raztopili v prečiščeni vodi (koncentracija 1,5 g/L) in raztopino hranili pri -20 °C.	GenScript, Piscataway, NJ, ZDA
Gostiteljski bakterijski sev	Proizvajalec
<i>E. coli</i> ER2738	
Trajna kultura bakterij <i>E. coli</i> ER2738 je bila hranjena pri -80 °C v zmesi tekočega gojišča LB in glicerola (25 % (v/v)).	New England Biolabs, ZDA

Bakteriofagni kloni

K5

Aminokislinsko zaporedje na površini predstavljenega peptida vsebuje motiv HPQ, ki je odgovoren za vezavo fagnega klona K5 na streptavidin z visoko specifičnostjo in afiniteto. Pomnožen klon K5 smo v zmesi glicerola (50 % (v/v)) in gojišča LB hranili pri -20 °C.

Fagni klon K5 smo izolirali iz knjižnice Ph.D.-C7CTM z afinitetno selekcijo na streptavidin na enak način kot Lunder in sodelavci (71).

C7CM1

Pomnožen klon C7CM1 s titrom $3,8 \cdot 10^{13}$ pfu/mL je bil shranjen v zmesi glicerola (50 % (v/v)) in pufru PBS pri -20 °C.

Fagni klon C7CM1 je v okviru podiplomskega dela s pomočjo afinitetne selekcije na mišje mAb proti humanemu leptinu iz knjižnice Ph.D.-C7CTM izoliral Peter Molek (neobjavljeno).

C7C3-4, fagni klon brez inserta

Pomnožen fagni klon brez inserta s titrom $\sim 5 \cdot 10^{12}$ pfu/mL je bil v zmesi glicerola (50 % (v/v)) in pufru PBS shranjen pri -20 °C.

Fagni klon brez inserta C7C3-4 je v okviru diplomske naloge z afinitetno selekcijo na ghrelin iz knjižnice Ph.D.-C7CTM izoliral Miha Vodnik (72).

Oznaka začetnega oligonukleotida

-96 gIII

Nukleotidno zaporedje

CCCTCATAGTTAGCGTAACG

Antibiotik

Proizvajalec

tetraciklin; liofilizat

raztopina tetraciklina, pripravljena na sledeč način:

glicerol	40 mL
ddH ₂ O	40 mL
tetraciklin	1,6 g

Sigma, St. Louis,
MO, ZDA

Ohlajenemu avtoklaviranemu glicerolu smo preko membranskega filtra dodali vodno raztopino tetraciklina (40 g/L). Raztopino tetraciklina (20 g/L) smo hranili zaščiteno pred svetlobo pri -20 °C.

3.1.3 Pufri, raztopine in gojišča

Pufer	Sestava in postopek priprave	
fosfatni pufer s soljo, pH 7,4 (PBS)	NaCl	3,2 g
	KCl	0,08 g
	Na ₂ HPO ₄	0,576 g
	KH ₂ PO ₄	0,096 g
	ddH ₂ O	400 mL
	Navedene količine sestavin smo ob mešanju z magnetnim mešalom raztopili v 400 mL ddH ₂ O. Z NaOH oz. HCl smo uravnali pH na 7,4, raztopino avtoklavirali in jo shranili pri sobni temperaturi.	
blokirmi pufer ECL (3 % raztopina blokirnega sredstva ECL Advance™)	blokirno sredstvo ECL Advance™	15 mg
	PBS	0,5 mL
	Navedeno količino blokirnega sredstva ECL Advance™ smo raztopili v pufru PBS in raztopino dobro premešali. Blokirni pufer smo pripravljali za sprotno uporabo.	
blokirmi pufer mleka v prahu	3 % raztopina mleka v prahu:	
	mleko v prahu	300 mg
	PBS	10 mL
	5 % raztopina mleka v prahu:	
	mleko v prahu	500 mg
	PBS	10 mL
	Navedeno količino mleka v prahu smo raztopili v pufru PBS in raztopino dobro premešali. Blokirni pufer smo pripravljali za sprotno uporabo.	
elucijski pufer (0,2 M glicin-HCl, 1 g/L BSA, pH 2,2)	glicin	300 mg
	BSA	20 mg
	ddH ₂ O	20 mL
	Ustrezni količini glicina in BSA smo raztopili v 20 mL ddH ₂ O. S HCl smo uravnali pH raztopine na 2,2. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo, jo razdelili v mikrocentrifugirke, ki smo jih hranili pri sobni temperaturi.	
nevtralizacijski pufer (1 M Tris-HCl, pH 9,1)	Tris	2,423 g
	ddH ₂ O	20 mL
	Ustrezno količino Tris-a smo raztopili v 20 mL ddH ₂ O. S HCl smo uravnali pH raztopine na 9,1. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo, jo razdelili v mikrocentrifugirke, ki smo jih hranili pri sobni temperaturi.	

pufer za spiranje (PBST)	0,01 % PBST:	
	PBS	50 mL
	Tween [®] 20	5 µL
	0,1 % PBST:	
PBS	50 mL	
Tween [®] 20	50 µL	
0,2 % PBST:	PBS	50 mL
	Tween [®] 20	100 µL
0,5 % PBST:	PBS	50 mL
	Tween [®] 20	250 µL
V 50 mL pufera PBS smo odpipetirali ustrezen volumen Tween [®] -a 20 in raztopino dobro premešali. Pufer za spiranje smo pripravljali za sprotno uporabo.		
jodidni pufer, pH 8,0	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaI	4 M
	Ustrezne količine sestavin smo raztopili v 12 mL ddH ₂ O. Z HCl oz. NaOH smo uravnali pH raztopine na 8,0. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo in jo shranili pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo.	
pufer za kromogen substrat tetrametilbenzidin (TMB)	citronska kislina monohidrat	21 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	17,8 g
	ddH ₂ O	1 L
Predpisane količine sestavin smo raztopili v vodi in pH raztopine uravnali na 6. Pufer smo hranili pri 4 °C.		
Raztopina	Sestava in postopek priprave	
1 M raztopina IPTG	IPTG	2,383 g
	ddH ₂ O	10 mL
Natehtali smo predpisano količino IPTG in jo raztopili v 10 mL ddH ₂ O. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo, jo razdelili v mikrocentrifugirke, ki smo jih shranili pri -20 °C.		
2 % raztopina X-gal	X-gal	0,2 g
	DMF	10 mL
Natehtali smo predpisano količino X-gal-a in jo raztopili v 10 mL DMF. Raztopino smo razdelili v mikrocentrifugirke, ki smo jih zaščitene pred svetlobo hranili pri -20 °C.		

raztopina PEG/NaCl (20 % (w/v) PEG-8000, 2,5 M NaCl)	PEG-8000	8,0 g
	NaCl	5,85 g
	ddH ₂ O	do 40 mL
Natehtali smo ustrezni količini sestavin in z ddH ₂ O dopolnili do 40 mL. Zmes smo dobro premešali, raztopino avtoklavirali in jo shranili pri sobni temperaturi.		
raztopina kromogenega substrata TMB	TMB	50 % (v/v)
	pufer za TMB	50 % (v/v)
Želen volumen TMB smo razredčili v enakem volumnu ustreznega pufru. Raztopino smo pripravili tik pred uporabo.		

Gojišča	Sestava in postopek priprave	
tekoče gojišče LB	pepton	4 g
	kvasni ekstrakt	2 g
	NaCl	2 g
	ddH ₂ O	400 mL
Ustrezne količine sestavin smo raztopili v 400 mL ddH ₂ O. Raztopino smo avtoklavirali in jo shranili pri sobni temperaturi.		
trdno gojišče LB- agaroz (top agar)	tekoče gojišče LB	200 mL
	agaroz	1,4 g
	Ustrezno količino agaroze smo dispergirali v gojišču LB in mešanico avtoklavirali. Gojišče smo v komori z laminarnim pretokom zraka razdelili na pet 40 mL-alikvotov in jih shranili pri sobni temperaturi.	
trdno gojišče LB- agar/IPTG/X-gal	tekoče gojišče LB	400 mL
	agar	6 g
	1 M IPTG	84 µL
	2 % X-gal	800 µL
	S pomočjo magnetnega mešala smo ustrezno količino agarja dispergirali v tekočem gojišču LB. Suspenzijo smo avtoklavirali. Na 70 °C ohlajeni raztopini smo dodali ustrezen volumen raztopin IPTG in X-gal-a. Gojišče smo v komori z laminarnim pretokom zraka prelili v petrijevke s premerom 9 cm. Strjena gojišča smo hranili pri 4 °C.	

Sterilizacija pufov, raztopin in gojišč z nasičeno vodno paro je potekala 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1 bar. Za sterilizacijo s filtracijo smo uporabili sterilizacijske membranske filtre z velikostjo por 0,20 µm.

3.1.4 Laboratorijska oprema

Oprema	Proizvajalec
analitska tehtnica AB 104	Mettler Toledo, Kiisnacht, Švica
avtoklav Systec 2540 EL	Bel-Art products, Pequannock, NJ, ZDA
centrifugi 5804 R (F-34-6-38) in 5415 R (F-45-24-11)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan GENios	Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica
magnetni mešalnik Rotamix 550 MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
mikrotitrške ploščice Nunc-Immuno™ Module F8 MaxiSorp loose	Nunc, Roskilde, Danska
mikrotitrške ploščice TPP® Test Plate 96U 92097	TPP, Trasadingen, Švica
mikrovalovna pečica	LG, Seul, Južna Koreja
nitrocelulozna membrana Hybond™ ECL z velikostjo por 0,45 µm	GE Healthcare, Piscataway, NJ, ZDA
pH meter 691	Metrohm, Herisan, Švica
pipete (0,5-10; 10-100; 100-1000; 1000-5000) µL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
precizna tehtnica Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
sistem za analizo in dokumentacijo gelov ter membran G-box	Syngene, Frederick, MD, ZDA
spektrofotometer Nanodrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA
stresalnik Eppendorf Thermomixer Comfort, 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
stresalnik IKA® MS3 digital	IKA Works, Wilmington, ZDA
stresalniki Vibromix 314 EVT, Vibromix 403 EVT in Vibromix 104 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
zamrzovalnik	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokio, Japonska
zaščiten mikrobiološka komora LFVP 12	Iskra pio, Šentjernej, Slovenija

3.2 Metode

3.2.1 Nacepitev bakterij na trdno gojišče in priprava tekočih bakterijskih kultur

- **Nacepitev bakterij *E. coli* ER2738 na trdno agarno gojišče**

Raztopino tetraciklina smo s tekočim gojiščem LB redčili do koncentracije 4 g/L in s 100 μ L pripravljene raztopine premazali trdno gojišče LB-agar v petrijevki. Trajno kulturo *E. coli* ER2738 smo odtalili in jo razredčili s tekočim gojiščem LB v razmerju 1:10⁶. 50 μ L redčene kulture smo razmazali po površini trdnega gojišča z antibiotikom. Ustrezno označeno petrijevko smo ob robu zatesnili s parafilmom in jo preko noči inkubirali pri 37 °C. Petrijevko smo hranili pri 4 °C. Posamezne bakterijske kolonije smo mesec dni uporabljali za pripravo tekočih bakterijskih kultur.

- **Priprava bakterijske kulture za pomnoževanje eluata**

V erlenmajerico z 20 mL tekočega gojišča LB, s koncentracijo tetraciklina 20 mg/L, smo precepili kolonijo *E. coli* ER2738 s trdnega gojišča. Z aluminijasto folijo pokrito erlenmajerico smo stresali z 250 vrt./min pri temperaturi 37 °C do ocene ustrezne optične gostote (OD₆₀₀ 0,01-0,05).

- **Priprava bakterijske kulture za mikrobiološko titracijo**

V erlenmajerico z 10 mL tekočega gojišča LB, s koncentracijo tetraciklina 20 mg/L, smo precepili kolonijo *E. coli* ER2738 s trdnega gojišča. Z aluminijasto folijo pokrito erlenmajerico smo stresali z 250 vrt./min pri temperaturi 37 °C do ocene ustrezne optične gostote (OD₆₀₀ ~ 0,5).

- **Priprava prekonočne bakterijske kulture**

V erlenmajerico z 10 mL tekočega gojišča LB, s koncentracijo tetraciklina 20 mg/L, smo precepili kolonijo *E. coli* ER2738 s trdnega gojišča. Z aluminijasto folijo pokrito erlenmajerico smo preko noči stresali z 250 vrt./min pri temperaturi 37 °C.

- **Priprava bakterijske kulture za pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov**

Prekonočno bakterijsko kulturo *E. coli* ER2738 smo stokrat redčili s tekočim gojiščem LB in pripravljeno kulturo uporabili za pomnoževanje posameznih fagnih klonov.

3.2.2 Afinitetna selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-7TM na regijo Fc hIgG

- **Imobilizacija tarčne molekule fragmenta Fc hIgG**

V prvi in drugi stopnji selekcije bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-7TM smo uporabili raztopino tarčnega proteina v pufru PBS s koncentracijo 50 mg/L, v tretji selekcijski stopnji pa raztopino fragmenta Fc hIgG v pufru PBS s koncentracijo 25 mg/L. V prvi stopnji selekcije smo 100 µL raztopine tarčnega proteina nanegli v eno vdolbinico, v vseh naslednjih stopnjah pa v dve vdolbinici mikrotitrne ploščice, tako smo tudi vse raztopine in suspenzije v nadaljevanju nanašali v prvi stopnji v eno, v vseh naslednjih stopnjah selekcije pa v dve vdolbinici ploščice. Ploščico smo preko noči ob rahlem stresanju inkubirali pri 4 °C.

- **Blokada nezasedenih mest vdolbinice mikrotitrne ploščice**

V okviru izvedene selekcije smo raztopini tarčnega proteina v vdolbinici dodali 200 µL blokirnega pufru ECL in ploščico 1 h stresali s 50 vrt./min pri sobni temperaturi. Z blokado nezasedenih površin vdolbinice smo preprečili morebitno nespecifično vezavo (adsorpcijo) v nadaljevanju dodanih bakteriofagov na polistirensko površino mikrotitrne ploščice.

- **Odstranitev nevezanih molekul tarče in komponent blokirnega pufru**

Iz vdolbinice smo vsebino odlili in preostalo tekočino odstranili z rahlimi udarci ploščice ob papirnato brisačo na trdni površini. V vdolbinico smo odpipetirali 300 µL 0,1 % PBST in ploščico stresali s 100 vrt./min, 5 min pri sobni temperaturi. Opisan postopek spiranja smo ponovili štirikrat.

- **Vezava bakteriofagov na tarčni protein**

V prvi selekcijski stopnji smo 10 µL knjižnice linearnih heptapeptidov, ki vsebujejo $2 \cdot 10^{11}$ fagnih delcev (glede na raznolikost knjižnice je bil vsak klon teoretično prisoten v 71 kopijah), dodali 90 µL 0,1 % PBST in pripravljeno suspenzijo odpipetirali v vdolbinico ploščice. V sledečih stopnjah selekcije smo v vdolbinico ploščice nanegli 100 µL suspenzije bakteriofagov, pripravljene iz 10 µL predhodno pomnoženega eluata in 90 µL 0,1 % PBST. Ploščico smo v vseh primerih inkubirali 1h pri sobni temperaturi ob stresanju s 50 vrt./min.

- **Spiranje nevezanih bakteriofagov**

Iz vdolbinice smo odlili suspenzijo fagov in preostalo tekočino odstranili z rahlimi udarci ploščice ob papirnato brisačo na trdni površini. V prvi selekcijski stopnji smo v vdolbinico odpipetirali 300 μL 0,1 % PBST, v sledečih stopnjah selekcije pa smo uporabili 0,5 % PBST. Višja koncentracija površinsko aktivne snovi zmanjšuje možnost nastanka šibkih nespecifičnih nepolarnih interakcij med fagi in molekulami tarčnega proteina. Ploščico smo stresali s 100 vrt./min, 5 min pri sobni temperaturi. Opisan postopek spiranja smo ponovili desetkrat.

- **Elucija vezanih bakteriofagov**

Elucija vezanih fagov v okviru afinitetne selekcije bakteriofagov iz knjižnice linearnih heptapeptidov je potekala na specifičen in nespecifičen način. V prvi stopnji selekcije smo specifično elucijo fagov dosegli z uporabo raztopine proteinov A in G v pufru PBS, s koncentracijo posameznega proteina 200 mg/L. V vdolbinico smo odpipetirali 100 μL pripravljene raztopine in ploščico inkubirali 1 h ob stresanju s 50 vrt./min pri sobni temperaturi. Eluat smo iz vdolbinice odstranili, nakar je sledila nespecifična elucija preostalih vezanih fagov z uporabo elucijskega puфра (0,2 M Gly-HCl, pH 2,2). V vdolbinico smo odpipetirali 100 μL elucijskega puфра in ploščico 15 min inkubirali pri sobni temperaturi ob stresanju s 50 vrt./min. Kisli eluat smo prenesli v mikrocentrifugirko z 20 μL nevtralizacijskega puфра in vsebino premešali. Po 3 μL obeh eluatov smo porabili za mikrobiološko titracijo (3.2.5), preostanek obeh pa smo združili in prenesli v bakterijsko kulturo za pomnoževanje (3.2.4).

V sledečih stopnjah selekcije smo postopali enako, le da smo vezane bakteriofage iz prve vdolbinice eluirali na specifičen način s 100 μL raztopine proteinov A in G v pufru PBS (koncentraciji posameznega proteina sta bili 100 mg/L), iz druge vdolbinice pa na nespecifičen način s 100 μL elucijskega puфра. Po 3 μL obeh eluatov smo porabili za določitev števila eluiranih bakteriofagov (3.2.5), preostanek obeh eluatov pa smo ločeno pomnožili z okužbo gostiteljskih bakterijskih celic (3.2.4).

3.2.3 Afinitetna selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-C7CTM na regijo Fc hlgG

Na enak način, kot smo iskali klone z afiniteto do regije Fc iz knjižnice linearnih heptapeptidov (3.2.2), smo ligande regije Fc skušali najti tudi v bakteriofagni predstavitveni knjižnici naključnih cikličnih heptapeptidov Ph.D.-C7CTM.

3.2.4 Pomnoževanje eluatov in izolacija pomnoženih eluatov

Zaključenim selekcijskim stopnjam je sledilo pomnoževanje eluiranih fagov. Eluirane bakteriofage smo prenesli v bakterijsko kulturo za pomnoževanje eluata (3.2.1) in kulturo stresali z 250 vrt./min 4,5 h pri 37 °C. Fagi okužijo bakterije *E. coli* ER2738 in se z izkoriščanjem replikacijskih mehanizmov gostitelja pomnožijo, pri tem ne povzročijo lize celic, le upočasnijo delitev bakterij. Bakterijsko kulturo s pomnoženimi fagi smo nato 10 min centrifugirali pri 4 °C z 12860 g. Usedlino smo zavrgli in supernatant ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatant smo prelili v novo centrifugirko in mu dodali šestino njegovega volumna raztopine PEG/NaCl, dobro pretresli in centrifugirko preko noči inkubirali pri 4 °C. Oborjene fage smo od gojišča ločili s 15 min-centrifugiranjem pri 4 °C z 12860 g. Precipitat smo suspendirali v 1 mL pufru PBS in suspenzijo 5 min centrifugirali pri 4 °C s 16110 g. Supernatantu smo dodali 167 µL raztopine PEG/NaCl in mikrocentrifugirko 1 h inkubirali na ledu ter na ta način ponovno oborili fage. Oborino smo od supernatanta ločili z 10 min-centrifugiranjem pri 4 °C s 16110 g, jo ponovno suspendirali v 200 µL pufru PBS in suspenzijo centrifugirali pri 4 °C 1 min s 16110 g. Supernatant, pomnožen eluat, smo v označeni mikrocentrifugirki shranili pri 4 °C, 10 µL smo ga porabili v naslednji selekcijski stopnji, 2 µL pa za določitev titra (3.2.5).

3.2.5 Določanje titra bakteriofagov v nepomnoženih in pomnoženih eluatih

V sterilne centrifugirke volumna 10 mL smo nalili po 3 mL gojišča LB-agaroz, predhodno staljenega v mikrovalovni pečici, in jih do uporabe hranili pri 52 °C. Nato smo s tekočim gojiščem LB pripravili tri desetkratne redčitve (10^1 , 10^2 in 10^3) nepomnoženih eluatov (v zadnji stopnji izvedenih selekcij tudi 10^4 in 10^5) in tri desetkratne redčitve (10^8 , 10^9 in 10^{10}) pomnoženih eluatov. V mikrocentrifugirke smo prenesli po 200 µL bakterijske kulture za mikrobiološko titracijo (3.2.1) in jih okužili s po 10 µL posameznih redčitev eluatov. Bakterijsko kulturo s fagi smo premešali in jo prenesli v centrifugirko z agaroznim

gojiščem, na hitro ponovno premešali in vsebino prelili na trdno gojišče LB-agar/IPTG/X-gal, predhodno ogreto na 37 °C. Ohlajena gojišča smo ob robu zatesnili s parafilmom in jih preko noči inkubirali pri 37 °C. Gostiteljski sev *E. coli* ER2738 nosi zapis za ω -podenoto β -galaktozidaze, genom bakteriofaga M13 pa vsebuje gen *lacZ α* , ki nosi zapis za α -podenoto β -galaktozidaze. Gen nadzoruje promotor *lac UV5*. Z IPTG izzovemo indukcijo *Lac* operona in posledično sintezo funkcionalnega encima β -galaktozidaze, ki cepi substrat X-gal do modro obarvanega produkta. Naslednje jutro smo torej prešteli modre plake in izračunali število fagov v nepomnoženem eluatu (NE) (enačba 1) in titer fagov v pomnoženem eluatu (PE) (enačba 2), kjer R predstavlja ustrežno redčitev eluata s tekočim gojiščem LB in V_{NE} celoten volumen nepomnoženega eluata v μ L.

$$\text{št. fagov v NE [pfu]} = \text{št. plakov} \cdot R \cdot \frac{V_{NE}}{10 \mu\text{l}} \quad (\text{enačba 1})$$

$$\text{titer fagov v PE [pfu/}\mu\text{l]} = \frac{\text{št. plakov} \cdot R}{10 \mu\text{l}} \quad (\text{enačba 2})$$

3.2.6 Pomnoževanje in izolacija posameznih fagnih klonov

- **Pomnoževanje fagnih klonov tretjega nepomnoženega eluata**

V epruvete smo odpipetirali po 2 mL bakterijske kulture za pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov (3.2.1). Nato smo s sterilnimi pipetnimi nastavki z gojišč, iz katerih smo določili število bakteriofagov v tretjih nepomnoženih eluatih, prenesli po en plak v vsako epruveto. Izbrali smo med seboj dobro ločene plake in na ta način zagotovili, da je določen plak vseboval le fage enega klona. S 4,5 h-stresanjem epruвет pri 250 vrt./min in 37 °C smo pomnožili 23 klonov 3. NE, kjer smo elucijo na tarčo vezanih fagov dosegli s pufrom s pH 2,2 (3. NEn), 23 klonov 3. NE, kjer smo fage eluirali specifično z raztopino proteinov A in G (3. NEs), in dve pozitivni kontroli (PK): streptavidinski ligand K5 in vezalec mišjega mAb proti humanemu leptinu C7CM1 (v 2 mL bakterijske kulture za pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov smo inokulirali po 0,5 μ L omenjenih klonov v gojišču LB oz. zmesi pufru PBS in glicerola). Nato smo vsebino epruвет prenesli v mikrocentrifugirke in bakterijske celice od supernatanta z vsebujočimi fagi ločili z 10 min-centrifugiranjem pri 4 °C z 12860 g. Supernatant smo prelili v nov komplet mikrocentrifugirk in ponovno centrifugirali pri

enakih pogojih. Supernatant smo ponovno prelili v nov komplet mikrocentrifugirk in suspenzijo fagov v gojišču LB hranili pri 4 °C. Afiniteto fagnih klonov 3. NE smo ovrednotili s testoma ELISA (3.2.7.2).

- **Pomnoževanje bakteriofagnih klonov z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo do regije Fc hIgG**

Za potrebe podrobnejšega vrednotenja fagnih klonov z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo do regije Fc hIgG (3.2.9) smo v večjem volumnu gostiteljske kulture pomnožili predstavnike treh bakteriofagnih klonov (1s, 7s in 3n). Po 5 µL posameznega fagnega klona v gojišču LB smo odpipetirali v 20 mL bakterijske kulture za pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov (3.2.1) in kulturo stresali z 250 vrt./min 4,5 h pri 37 °C. Sledeči koraki izolacije in čiščenja pomnoženih bakteriofagov so potekali na enak način kot izolacija pomnoženih eluatov (3.2.4). Suspenzije fagov v pufru PBS smo hranili pri 4 °C.

3.2.7 Ocena afinitete pomnoženih eluatov in posameznih fagnih klonov do regije Fc hIgG z encimskoimunskim testom na trdnem nosilcu

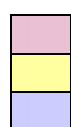
3.2.7.1 Kvalitativna ocena afinitete nabora bakteriofagov iz pomnoženih eluatov

Afiniteto vezave celotne populacije fagov posameznih PE na fragment Fc hIgG smo ocenili s testom ELISA in na ta način ovrednotili potek selekcije iz knjižnice Ph.D.-7TM. V 6 vdolbinic mikrotitrne ploščice smo adsorbirali fragment Fc hIgG, v eno vdolbinico pa streptavidin (3.2.2). Prihodnji dan smo raztopinam tarčnega proteina dodali po 200 µL 3 % blokirnega pufru mleka v prahu, v prazne vdolbinice poleg njih, ki so služile za slepo kontrolo (SK), pa po 300 µL 3 % blokirnega pufru mleka v prahu in 1 h blokiral nezasedene površine vdolbinic. Pripravili smo po 200 µL redčitev posameznih PE (1. PE, dveh 2. PE in dveh 3. PE, kjer smo pri prvi selekciji uporabljali nespecifične (2. PEn in 3. PEn), pri drugi pa specifične pogoje elucije (2. PEs in 3. PEs)) v 0,1 % PBST s končnim titrom 10¹⁰ pfu/100 µL. Vdolbinice smo dvakrat sprali z 0,1 % PBST in vanje nanесли po 100 µL pripravljenih redčitev PE oz. isti titer fagov brez inserta (klon C7C3-4), ki je predstavljal negativno kontrolo (NK), ali fagov klona K5 kot pozitivno kontrolo (PK) (preglednica II). Ploščico smo 1,5 h stresali s 50 vrt./min. Nato smo vdolbinice trikrat sprali z 0,1 % PBST. V vsako smo nanесли po 200 µL raztopine anti-M13-mAb-HRP, pri

čemer smo osnovno raztopino mAb redčili z 0,2 % posnetim mlekom v prahu v 0,1 % PBST v razmerju 1:5000. Nadalje smo ploščico 1 h stresali s 50 vrt./min. Vdolbinice smo štirikrat sprali z 0,1 % PBST in v vsako odpipetirali po 200 μ L pripravljene raztopine substrata TMB. Hrenova peroksidaza katalizira oksidacijo TMB do modro obarvanega produkta. V roku 15 min smo v vdolbinice dodali po 50 μ L 2 M raztopine H₂SO₄, na ta način zaustavili reakcijo, in izmerili absorbanco rumeno obarvane tekočine pri valovni dolžini 450 nm.

Preglednica II: Razporeditev vzorcev pomnoženih eluatov in kontrol na mikrotitrski ploščici.

	1	2
A	1.PE	1.PE
B	2.PEs	2.PEs
C	2.PEn	2.PEn
D	3.PEs	3.PEs
E	3.PEn	3.PEn
F	NK	NK
G	PK	PK


 raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (20 mg/L)
 raztopina streptavidina v pufru PBS (20 mg/L)
 vdolbinica brez adsorbiranega tarčnega proteina





3.2.7.2 Kvalitativna ocena afinitete posameznih fagnih klonov

Izvedli smo dva testa ELISA, s katerima smo ovrednotili afiniteto izbranih bakteriofagnih klonov 3. NE iz knjižnice Ph.D.-7TM do fragmenta Fc hIgG. Za prvi poizkus smo izbrali 12 klonov iz selekcije s specifično (1-12s) in 12 klonov iz selekcije z nespecifično elucijo vezanih fagov (1-12n). V 27 vdolbinic mikrotitrške ploščice smo adsorbirali fragment Fc hIgG, v naslednji dve vdolbinici pa streptavidin oz. mišje mAb proti humanemu leptinu (3.2.2). Površino vdolbinic smo blokirali s posnetim mlekom in jih dvakrat sprali z 0,1 % PBST. 240 μ L posameznega fagnega klona v gojišču LB smo dodali 240 μ L 0,1 % PBST in po 200 μ L pripravljene suspenzije fagov nanесли v vdolbinico brez in z adsorbiranim fragmentom Fc hIgG. V naslednji dve vzorčni in pripadajoči slepi vdolbinici smo nanесли po 100 μ L 3. PEs oz. 3. PEn v 0,1 % PBST s koncentracijo 10¹⁰ pfu/100 μ L. V sledeči dve vdolbinici smo odpipetirali po 10¹⁰ pfu klona C7C3-4 (NK). V vdolbinico z adsorbiranim streptavidinom in slepo vdolbinico poleg nje smo nanесли po 200 μ L suspenzije fagov klona K5 (PK), v zadnjo vzorčno in pripadajočo slepo vdolbinico pa smo odpipetirali po 200 μ L suspenzije fagov klona C7CM1 (PK) (preglednica III). Obe PK smo predhodno pripravili z dvakratnim redčenjem klonov K5 oz. C7CM1 v gojišču LB z 0,1 % PBST. Sledeči koraki spiranja nevezanih fagov, nanosa

protiteles, spiranja nevezanih protiteles, nanosa substrata in merjenja absorbance so potekali enako kot pri testu ELISA, s katerim smo vrednotili afiniteto PE do fragmenta Fc hIgG (3.2.7.1).

Preglednica III: Razporeditev vzorcev fagnih klonov tretjega nepomnoženega eluata in kontrol na mikrotitrski ploščici.




	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1s	1s	9s	9s	5n	5n	3.PEs	3.PEs
B	2s	2s	10s	10s	6n	6n	3.PEn	3.PEn
C	3s	3s	11s	11s	7n	7n	NK	NK
D	4s	4s	12s	12s	8n	8n	PK _(K5)	PK _(K5)
E	5s	5s	1n	1n	9n	9n	PK _(C7CM1)	PK _(C7CM1)
F	6s	6s	2n	2n	10n	10n		
G	7s	7s	3n	3n	11n	11n		
H	8s	8s	4n	4n	12n	12n		

	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (50 mg/L)
	raztopina streptavidina v pufru PBS (50 mg/L)
	raztopina mišjega mAb proti humanemu leptinu v pufru PBS (50 mg/L)
	vdolbinica brez adsorbiranega tarčnega proteina

Test ELISA s preostalimi 11 kloni iz selekcije s specifično (13-23s) in 11 kloni iz selekcije z nespecifično elucijo vezanih fagov (13-23n) je potekal na enak način. Razlika je bila zgolj v tem, da suspenzij fagov 3. PEs in 3. PEn ter pozitivne kontrole C7CM1 nismo nanašali (preglednica IV).

Preglednica IV: Razporeditev vzorcev fagnih klonov tretjega nepomnoženega eluata in kontrol na mikrotitrski ploščici.

	1	2	3	4	5	6
A	13s	13s	21s	21s	18n	18n
B	14s	14s	22s	22s	19n	19n
C	15s	15s	23s	23s	20n	20n
D	16s	16s	13n	13n	21n	21n
E	17s	17s	14n	14n	22n	22n
F	18s	18s	15n	15n	23n	23n
G	19s	19s	16n	16n	NK	NK
H	20s	20s	17n	17n	PK _(K5)	PK _(K5)

	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (50 mg/L)
	raztopina streptavidina v pufru PBS (50 mg/L)
	vdolbinica brez adsorbiranega tarčnega proteina

3.2.8 Izolacija in čiščenje bakteriofagne DNA ter določanje nukleotidnega zaporedja inserta

Na osnovi rezultatov opravljenih presejalnih testov ELISA (4.1.3) smo osmim bakteriofagnim klonom z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo vezave fragmenta Fc hIgG (1s, 7s, 8s, 21s, 23s, 3n, 16n, 20n) izolirali genomsko DNA ter določili nukleotidno zaporedje inserta, ki nosi zapis za površinsko predstavljen peptid. 500 μ L posameznega bakteriofagnega klona v gojišču LB smo dodali 200 μ L raztopine PEG/NaCl, dobro premešali in mikrocentrifugirko inkubirali 10-20 min pri sobni temperaturi. Oborjene fage smo od supernatanta ločili z 10 min-centrifugiranjem pri 4 °C s 16110 g. Usedlino smo suspendirali v 100 μ L jodidnega pufra, vsebino dobro premešali in ji dodali 250 μ L 96 % etanola, premešali in mešanico inkubirali 10-20 min pri sobni temperaturi. Kaotropni jodidni ioni so odgovorni za razbitje virusne kapside, etanol obarja fagno DNA, virusni proteini se v primeru kratkotrajne izpostavljenosti etanolu ne oborijo. Oborjeno fagno DNA smo od supernatanta ločili z 10 min-centrifugiranjem pri 4 °C s 16110 g in jo sprali s 500 μ L 70 % etanola, ohlajenega na -20 °C. Usedlino smo ponovno od supernatanta ločili z 10 min-centrifugiranjem pri 4 °C s 16110 g. Oborjeno DNA smo 30 min sušili pri 37 °C. Ustrezno označene mikrocentrifugirke z vzorci fagne DNA smo poslali podjetju Eurofins MWG Operon iz Nemčije, ki je opravilo določitev nukleotidnega zaporedja insertov izbranih bakteriofagnih klonov z metodo po Sangerju oz. t.i. dideoksi metodo, z uporabo začetnega oligonukleotida -96 gIII. Nukleotidna zaporedja insertov izbranih fagnih klonov smo prevedli v aminokislinska zaporedja površinsko izraženih peptidov s pomočjo programske opreme Translate tool (73).

3.2.9 Podrobnejše vrednotenje bakteriofagnih klonov z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo vezave regije Fc hIgG s testi ELISA

3.2.9.1 Določanje titra fagnih klonov 1s, 7s in 3n

S pomočjo spektrofotometra Nanodrop ND-1000 smo izmerili absorbance desetkratnih redčitev suspenzij fagnih klonov 1s, 7s, 3n in C7CM1 v pufru PBS pri valovnih dolžinah 269 nm (absorpcijski maksimum nitastega bakteriofaga; le-tega sestavlja 6-krat več proteinov kot DNA, proteini zato znatno prispevajo k absorpcijskemu spektru faga) in 320 nm (absorpcija svetlobe fagnih kromoforov je pri tej valovni dolžini nizka, merimo absorbanco ozadja (sipanje svetlobe, kontaminanti)) ter na empiričen način (enačba 3) določili njihove titre. Konstanta 7255 predstavlja število nukleotidnih baz, ki sestavljajo krožno enoverižno DNA viriona (74).




$$\text{titer bakteriofagnih klonov [pfu/ml]} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \cdot 10 \cdot 6 \cdot 10^{16}}{7255} \quad (\text{enačba 3})$$

3.2.9.2 Kvalitativna ocena afinitete fagnih klonov do humane regije Fc infliksimaba

S testom ELISA smo ocenili sposobnost vezave bakteriofagnih klonov, ki so v presejalnih testih ELISA izkazovali najvišjo afiniteto selektivne vezave regije Fc hIgG (4.1.3) (kloni 1s, 7s in 3n), na fragment Fc infliksimaba. V tri vdolbinice mikrotitrne ploščice smo adsorbirali infliksimab, v eno vdolbinico pa regije Fc hIgG (3.2.2). Nezasedene površine smo blokirali s posnetim mlekom in jih dvakrat sprali z 0,1 % PBST. Ker so bili titri suspenzij fagnih klonov 1s, 7s in 3n v pufru PBS enakega velikostnega razreda (preglednica XIII), smo v vdolbinico z in brez adsorbiranega infliksimaba odpipetirali po 100 μL suspenzije posameznih omenjenih bakteriofagnih klonov, redčenih do koncentracije $\sim 5 \cdot 10^{11}$ pfu/mL z 0,1 % PBST. V vdolbinico z adsorbiranim fragmentom Fc in pripadajočo slepo vdolbinico smo nanegli po 100 μL suspenzije klona 3n (PK) (preglednica V). Ploščico smo 1,5 h inkubirali pri sobni temperaturi ob stresanju s 50 vrt./min in nadalje (spiranje nevezanih fagov, nanos protiteles, spiranje nevezanih protiteles, nanos substrata in merjenje absorbance) postopali enako kot pri testu ELISA, s katerim smo vrednotili afiniteto PE do regije Fc hIgG (3.2.7.1).

Preglednica V: Razporeditev vzorcev fagnih klonov 1s, 7s in 3n ter kontrole na mikrotitrski ploščici.

	1
A	1s
B	1s
C	7s
D	7s
E	3n
F	3n
G	3n
H	3n

	raztopina infliksimaba v pufru PBS (100 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (100 mg/L)
	vdolbinica brez adsorbiranega tarčnega proteina

3.2.9.3 Vrednotenje specifičnosti fagnih klonov s kvantitativnimi testi ELISA

Da bi ovrgli možnost nespecifične vezave smo predstavnike bakteriofagnih klonov, ki so v predhodno izvedenih presejalnih testih ELISA izkazovali najvišjo afiniteto in selektivnost do tarčnega proteina (4.1.3), klone 1s, 7s, 3n, ovrednotili s tremi kvantitativnimi testi ELISA. V prvem smo podrobneje pogledali potek vezave suspenzij fagnih klonov enakih titrov na vdolbinice mikrotitrskе ploščice, prekrte z regijo Fc hIgG različnih koncentracij (adsorpcija iz raztopin v koncentracijskem območju 0-1,7 mg/L tarčnega proteina). V drugem encimskoimunskem testu smo postopali enako, le da smo na ploščico nanašali raztopine tarčnega proteina širšega koncentracijskega območja, 0-7,5 mg/L, v tretjem pa smo nad enako količino adsorbiranega tarčnega proteina inkubirali padajoče koncentracije omenjenih fagnih klonov. V prvem in tretjem poskusu smo uporabili tudi bakteriofagni klon C7CM1, vezalec mišjega mAb proti humanemu leptinu, na površini katerega so predstavljeni peptidi, strukturno nesorodni peptidom na klonih 1s, 7s in 3n.

Pri prvem poskusu smo v 24 vdolbinic mikrotitrskе ploščice nanegli po 100 μ L raztopine fragmenta Fc hIgG v pufru PBS padajočih koncentracij; 1 \cdot 7, 1 \cdot 4, 1 \cdot 1, 0 \cdot 8, 0 \cdot 5 in 0 \cdot 2 mg/L. V zadnjo vdolbinico štirih stolpcev mikrotitrskе ploščice tarče nismo adsorbirali (preglednica VI). Ploščico smo 1 h inkubirali pri 37 $^{\circ}$ C in nato nezasedene površine vdolbinic blokirali s posnetim mlekom. Vdolbinice smo dvakrat sprali z 0,1 % PBST in vanje odpipetirali po 100 μ L suspenzije posameznih bakteriofagnih klonov 1s, 7s, 3n in C7CM1, redčenih z 0,1 % PBST do koncentracije $\sim 1\cdot 10^{11}$ pfu/mL. Ploščico smo 1,5 h inkubirali pri sobni temperaturi ob stresanju s 50 vrt./min in nadalje postopali enako kot pri testu ELISA, s katerim smo vrednotili afiniteto PE do regije Fc hIgG (3.2.7.1).

Preglednica VI: Razporeditev vzorcev fagnih klonov 1s, 7s in 3n ter kontrolnega klona C7CM1 na mikrotitrski ploščici.

	1	2	3	4
A	1s	7s	3n	C7CM1
B	1s	7s	3n	C7CM1
C	1s	7s	3n	C7CM1
D	1s	7s	3n	C7CM1
E	1s	7s	3n	C7CM1
F	1s	7s	3n	C7CM1
G	1s	7s	3n	C7CM1

	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (1·7 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (1·4 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (1·1 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (0·8 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (0·5 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (0·2 mg/L)
	vdolbinica brez adsorbiranega tarčnega proteina

Pri drugem encimskoimunskem testu smo v 21 vdolbinic mikrotitrške ploščice nanesti po 100 µL raztopine tarčnega proteina v pufru PBS padajočih koncentracij; 7·5, 3·75, 1·88, 0·94, 0·47, 0·23 in 0·12 mg/L. V zadnjo vdolbinico treh stolpcev mikrotitrške ploščice tarče nismo adsorbirali (preglednica VII). Ploščico smo preko noči inkubirali pri 4 °C in nato nezasedene površine vdolbinic blokirali s posnetim mlekom. Vdolbinice smo dvakrat sprali z 0,1 % PBST in vanje odpipetirali po 100 µL suspenzije posameznih bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n, redčenih z 0,1 % PBST do koncentracije $\sim 1 \cdot 10^{11}$ pfu/mL. Ploščico smo 1,5 h inkubirali pri sobni temperaturi ob stresanju s 50 vrt./min in nadalje postopali enako kot pri testu ELISA, s katerim smo vrednotili afiniteto PE do regije Fc hIgG (3.2.7.1).

Preglednica VII: Razporeditev vzorcev fagnih klonov 1s, 7s in 3n na mikrotitrski ploščici.

	1	2	3
A	1s	7s	3n
B	1s	7s	3n
C	1s	7s	3n
D	1s	7s	3n
E	1s	7s	3n
F	1s	7s	3n
G	1s	7s	3n
H	1s	7s	3n

	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (7.5 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (3.75 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (1.88 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (0.94 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (0.47 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (0.23 mg/L)
	raztopina fragmenta Fc hIgG v pufru PBS (0.12 mg/L)
	vdolbinica brez adsorbiranega tarčnega proteina

Pri tretjem poskusu smo v 28 vdolbinic mikrotitrne ploščice nanesti po 100 µL tarčnega proteina v pufru PBS s koncentracijo 1 mg/L in ploščico 1 h inkubirali pri 37 °C. Nezasedene površine vdolbinic smo blokirali s posnetim mlekom in jih dvakrat sprali z 0,1 % PBST. Vanje smo odpipetirali po 100 µL suspenzije posameznih bakteriofagnih klonov 1s, 7s, 3n in C7CM1 padajočih koncentracij, predhodno pripravljenih z ustreznimi redčenji v 0,1 % PBST tako, da so končne suspenzije vsebovale 1.0, 0.85, 0.7, 0.55, 0.4, 0.25 in 0.1 µL osnovne suspenzije fagnih klonov v pufru PBS (titri suspenzij klonov 1s, 7s, 3n in C7CM1 v pufru PBS so med seboj primerljivi (preglednica XIII)) (preglednica VIII). Ploščico smo 1,5 h stresali s 50 vrt./min pri sobni temperaturi in nadalje postopali enako kot pri testu ELISA, s katerim smo vrednotili afiniteto PE do fragmenta Fc hIgG (3.2.7.1).

Preglednica VIII: Razporeditev vzorcev fagnih klonov 1s, 7s in 3n ter kontrolnega klona C7CM1 na mikrotitrski ploščici.

	1	2	3	4
A	1s	7s	3n	C7CM1
B	1s	7s	3n	C7CM1
C	1s	7s	3n	C7CM1
D	1s	7s	3n	C7CM1
E	1s	7s	3n	C7CM1
F	1s	7s	3n	C7CM1
G	1s	7s	3n	C7CM1

	nanos 1.0 µL osnovne suspenzije fagnega klona v pufru PBS
	nanos 0.85 µL osnovne suspenzije fagnega klona v pufru PBS
	nanos 0.7 µL osnovne suspenzije fagnega klona v pufru PBS
	nanos 0.55 µL osnovne suspenzije fagnega klona v pufru PBS
	nanos 0.4 µL osnovne suspenzije fagnega klona v pufru PBS
	nanos 0.25 µL osnovne suspenzije fagnega klona v pufru PBS
	nanos 0.1 µL osnovne suspenzije fagnega klona v pufru PBS

3.2.9.4 Kompetitivni test ELISA vezave bakteriofagnih klonov

Specifičnost bakteriofagnih klonov, ki so v presejalnih testih ELISA izkazovali najvišjo afiniteto vezave regije Fc hIgG (4.1.3) (1s, 7s in 3n), smo ovrednotili tudi s kompetitivno različico encimskoimunskega testa. Na površino mikrotitrne ploščice adsorbiran fragment Fc tekmuje s prostim fragmentom Fc hIgG v raztopini za vezavo na peptide, izražene na površini posameznih fagnih klonov.

V 16 vdolbinic mikrotitrne ploščice smo adsorbirali regijo Fc hIgG (3.2.2) in nezasedene površine blokirali s posnetim mlekom. Vdolbinice smo dvakrat sprali z 0,1 % PBST. V prve štiri vdolbinice smo odpipetirali po 100 μ L suspenzije bakteriofagnega klona 1s s titrom $\sim 10^{11}$ pfu/mL, z dodatkom naraščajočih koncentracij tarčnega proteina. V prvo vdolbinico smo tako dodali 5 μ g, v drugo 0,5 μ g, v tretjo 0,05 μ g fragmenta Fc hIgG, v četrto pa tarčnega proteina nismo nanegli. Na enak način smo nanašali tudi bakteriofagna klona 7s in 3n ter tako zapolnili naslednjih osem vdolbinic. V zadnje štiri vdolbinice smo zopet nanašali suspenzijo fagnega klona 1s, le da smo ji tokrat dodali naraščajoče koncentracije infliksimaba. V prvo vdolbinico smo tako dodali 7,5 μ g, v drugo 0,75 μ g, v tretjo 0,075 μ g infliksimaba, v četrto pa protitelesa nismo nanegli (preglednica IX). Ploščico smo 1,5 h stresali s 50 vrt./min pri sobni temperaturi in nadalje postopali enako kot pri testu ELISA, s katerim smo vrednotili afiniteto nabora bakteriofagov iz PE do regije Fc hIgG (3.2.7.1).

Preglednica IX: Razporeditev vzorcev fagnih klonov 1s, 7s in 3n z dodanimi različnimi količinami fragmenta Fc oz. infliksimaba na mikrotitrski ploščici.

	1	2	
A	1s	3n	dodatek 5 μ g fragmenta Fc hIgG
B	1s	3n	dodatek 0,5 μ g fragmenta Fc hIgG
C	1s	3n	dodatek 0,05 μ g fragmenta Fc hIgG
D	1s	3n	suspenzija fagnega klona brez dodanega topnega fragmenta Fc/infliksimaba
E	7s	1s	dodatek 7,5 μ g infliksimaba
F	7s	1s	dodatek 0,75 μ g infliksimaba
G	7s	1s	dodatek 0,075 μ g infliksimaba
H	7s	1s	

3.2.10 Kvalitativno vrednotenje vezave sinteznega peptida na humano regijo Fc z “imunoprecipitacijo” in sledečim testom točkovnega nanosa (ang. dot blot)

Sposobnost vezave sinteznega peptida p3n na regijo Fc hIgG smo ovrednotili s testom, analognim imunoprecipitaciji (vezavo regij Fc hIgG na biotiniliran sintezni peptid in zajetjem kompleksov na paramagnetne kroglice, prekrte s streptavidinom), ter sledečo detekcijo eluirane regije Fc, adsorbirane na nitrocelulozno membrano, s konjugatom anti-Fc hIgG-HRP. Za testni vzorec smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 0,7 μ L peptida p3n (400 pmol) in 20 μ L regije Fc (1 nmol) ter vsebino preko noči inkubirali pri 4 °C. Na enak način smo pripravili slepi vzorec, le da peptida nismo dodali. Naslednje jutro smo mikrocentrifugirki 30 min inkubirali pri sobni temperaturi med stresanjem s 600 vrt./min. Pripravili smo dva 50 μ L-alikvota paramagnetnih kroglic s kovalentno vezanim streptavidinom in ju s pomočjo 2 min-inkubacije mikrocentrifugirk v magnetnem stojalu dvakrat sprali s po 200 μ L 0,01 % PBST. Alikvotoma kroglic smo dodali raztopino testnega oz. slepega vzorca in mikrocentrifugirki 30 min stresali s 600 vrt./min pri sobni temperaturi. Nato smo kroglice trikrat sprali s po 200 μ L 0,01 % PBST. Vzorcema smo dodali po 20 μ L 8 M uree in ju 2 h inkubirali pri 37 °C ob stresanju s 600 vrt./min.

Sledil je nanos vzorcev na nitrocelulozno membrano. Nanesli smo po 20 μ L eluata testnega oz. slepega vzorca, po 5 μ L raztopine regije Fc treh različnih koncentracij (20 mg/L, 2 mg/L in 200 μ g/L) (PK) ter 5 μ L raztopine papaina s koncentracijo 60 mg/L (NK). Membrano smo 1 h sušili pri sobni temperaturi. Sledilo je blokiranje nezasedenih površin membrane v 25 mL 5 % raztopine mleka v prahu v 0,01 % PBST (1 h pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju). Nadalje smo membrano ob rahlem stresanju pri sobni temperaturi 1 h inkubirali z raztopino anti-Fc hIgG-HRP, pri čemer smo osnovno raztopino protitelesa redčili z 0,01 % PBST v razmerju 1:5000. Membrano smo štirikrat sprali (15 min z 0,01 % PBST, dvakrat po 5 min z 0,01 % PBST, 5 min s PBS). Sledila je 5 min-inkubacija membrane s kemiluminiscentnim substratom in zajemanje signala.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Afinitetni selekciji bakteriofagov iz knjižnic Ph.D.-7TM in Ph.D.-C7CTM na regijo Fc hIgG

4.1.1 Vrednotenje poteka selekcije s spremljanjem deleža eluiranih bakteriofagov

V knjižnici linearnih heptapeptidov smo skušali najti klone z afiniteto do fragmenta Fc hIgG preko treh stopenj afinitetne selekcije. Po vsaki zaključeni selekcijski stopnji smo določili število fagov v NE in titer fagov v PE (3.2.5), 10 μ L katerega smo vnesli v naslednjo selekcijsko stopnjo. S pomočjo obeh podatkov smo za posamezno stopnjo selekcije izračunali odstotek elucije (%E), ki predstavlja razmerje med številom eluiranih bakteriofagov in številom vseh bakteriofagov, ki so vstopili v selekcijsko stopnjo, pomnoženo s številom sto (preglednica X, preglednica XI). S pomočjo %E smo ovrednotili potek obeh izvedenih afinitetnih selekcij, t.j. z uporabo specifičnega (s) in nespecifičnega (n) načina elucije vezanih fagov.

V prvi stopnji selekcije smo s pomočjo raztopine proteinov A in G eluirali $1,5 \cdot 10^4$ pfu, s sledečo uporabo elucijskega puфра s pH 2,2 pa še dodatnih $1,1 \cdot 10^4$ pfu. Skupno število bakteriofagov, ohranjenih po 1. selekcijski stopnji, je razmeroma nizko ($2,6 \cdot 10^4$ pfu), saj jih izmed $2,8 \cdot 10^9$ različnih fagnih klonov, vsak pa je bil teoretično prisoten v 71 kopijah, le majhen delež izkazuje zadostno afiniteto do fragmenta Fc, da kljub spiranju ostane v kompleksu z njim. Iz stopnje v stopnjo močno naraščajoč %E (slika 8, slika 9) priča o uspešno izvedenih selekcijah. %E narašča kljub zaostrenim pogojem v drugi (spiranje s puфrom PBS z višjo koncentracijo detergenta (0,5 % PBST)) in tretji selekcijski stopnji (uporaba manjše koncentracije raztopine tarčnega proteina, uporaba 0,5 % PBST). Dosegli smo $\sim 1,1 \cdot 10^4$ -kratno oz. $\sim 4,4 \cdot 10^3$ -kratno obogatitev za regijo Fc hIgG visokoafinitetnih klonov.

Preglednica X: Vnos fagov v selekcijsko stopnjo, število fagov v NE in odstotek elucije posamezne stopnje selekcije, pri kateri smo za elucijo vezanih fagov uporabili raztopino proteinov A in G.

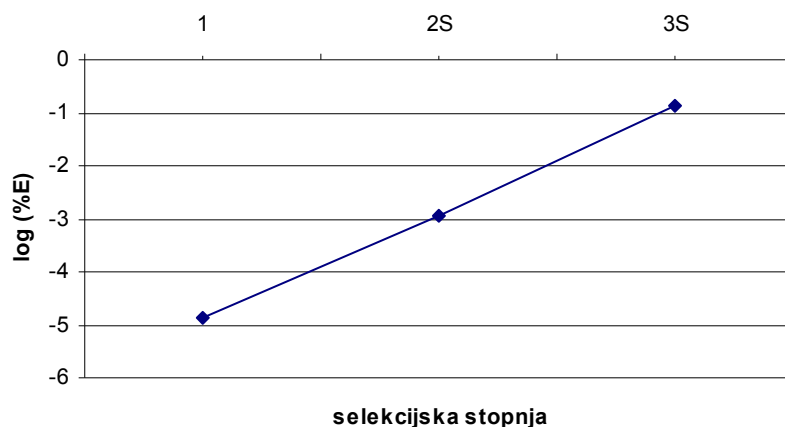
Selekcijska stopnja	Vnos (pfu)	Izplen (pfu)	%E
1	$2 \cdot 10^{11}$	$2,6 \cdot 10^4*$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
2s	$2,3 \cdot 10^{11}$	$2,6 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^{-3}$
3s	$1,4 \cdot 10^{11}$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^{-1}$

*Izplen prve selekcijske stopnje je prikazan kot vsota fagov, eluiranih z raztopino proteinov A in G ter sledečo elucijo s pufrom s pH 2,2.

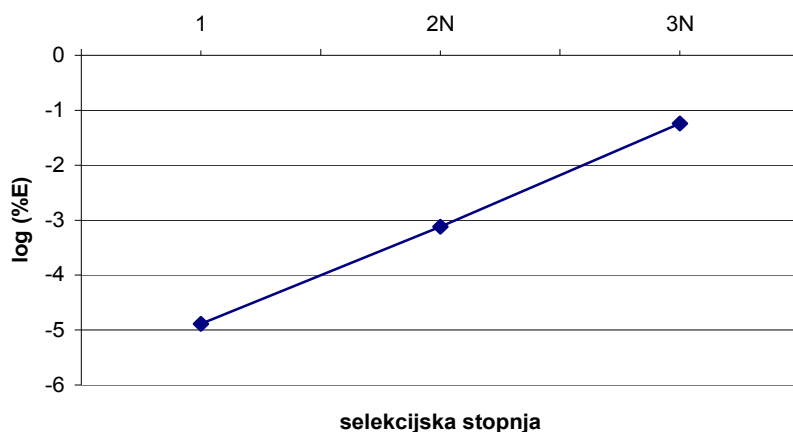
Preglednica XI: Vnos fagov v selekcijsko stopnjo, število fagov v NE in odstotek elucije posamezne stopnje selekcije, pri kateri smo za elucijo vezanih fagov uporabili pufer s pH 2,2.

Selekcijska stopnja	Vnos (pfu)	Izplen (pfu)	%E
1	$2 \cdot 10^{11}$	$2,6 \cdot 10^4*$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
2n	$2,3 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^6$	$7,8 \cdot 10^{-4}$
3n	$1,5 \cdot 10^{11}$	$8,7 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^{-2}$

*Izplen prve selekcijske stopnje je prikazan kot vsota fagov, eluiranih z raztopino proteinov A in G ter sledečo elucijo s pufrom s pH 2,2.



Slika 8: Naraščanje odstotka elucije (%E) tekom selekcije, pri kateri smo za elucijo vezanih fagov uporabili raztopino proteinov A in G.



Slika 9: Naraščanje odstotka elucije (%E) tekom selekcije, pri kateri smo za elucijo vezanih fagov uporabili pufer s pH 2,2.

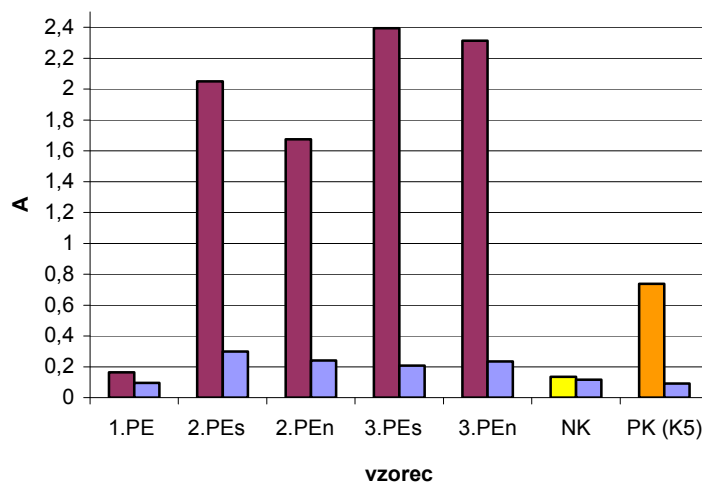
Na enak način, kot smo iskali klone z afiniteto do regije Fc iz knjižnice linearnih heptapeptidov, smo ligande regije Fc skušali najti tudi v bakteriofagni predstavitveni knjižnici naključnih cikličnih heptapeptidov Ph.D.-C7CTM. Iz stopnje v stopnjo selekcije se %E ni povečeval, kar nakazuje na neuspešen potek afinitetne selekcije (rezultati niso prikazani).

4.1.2 Kvalitativna ocena afinitete nabora bakteriofagov iz pomnoženih eluatov

Afiniteto vezave celotne populacije fagov posameznih PE na fragment Fc hIgG smo ocenjevali s testom ELISA (3.2.7.1) in na ta način potrdili uspešen potek selekcij iz knjižnice Ph.D.-7TM. Suspenzije fagov smo nanašali v vdolbinice z in brez adsorbirane tarčne molekule, slednje so nam služile kot slepe kontrole (SK). Razmeroma nizki signali SK zavračajo možnost nespecifične vezave bakteriofagov na polistirensko površino mikrotitrnske ploščice v večjem obsegu.

Naraščajoče vrednosti odzivov vzorcev od 1. do 3. PE selekcije, kjer smo vezane fage eluirali na specifičen način (2. PEs in 3. PEs), in selekcije, kjer smo za elucijo uporabili pufer s pH 2,2 (2. PEn in 3. PEn), dokazujejo, da tekom selekcij delež fagnih klonov z afiniteto do regije Fc hIgG v PE narašča. Razmerje vrednosti izmerjenih absorbanc vzorca in SK 2. PE znaša ~ 6,8 ter se pri 3. PE še poviša, kar kaže na vedno bolj specifično vezavo nabora fagov s fragmentom Fc. Odziva vzorca in SK fagnega klona brez inserta C7C3-4, ki predstavljata negativno kontrolo (NK), sta nizka, kar nakazuje, da klon, ki na

površini peptidov ne izraža, pri izbranih pogojih testa ne interagira niti s tarčo niti s polistirensko površino ploščice. Za pozitivno kontrolo (PK) smo v vdolbinico adsorbirali streptavidin in nadalje uporabili zanj specifični vezalec K5. Visoka vrednost absorbance vzorca in nizka vrednost SK dokazujeta ustrezno izvedbo opravljenega testa ELISA (slika 10).



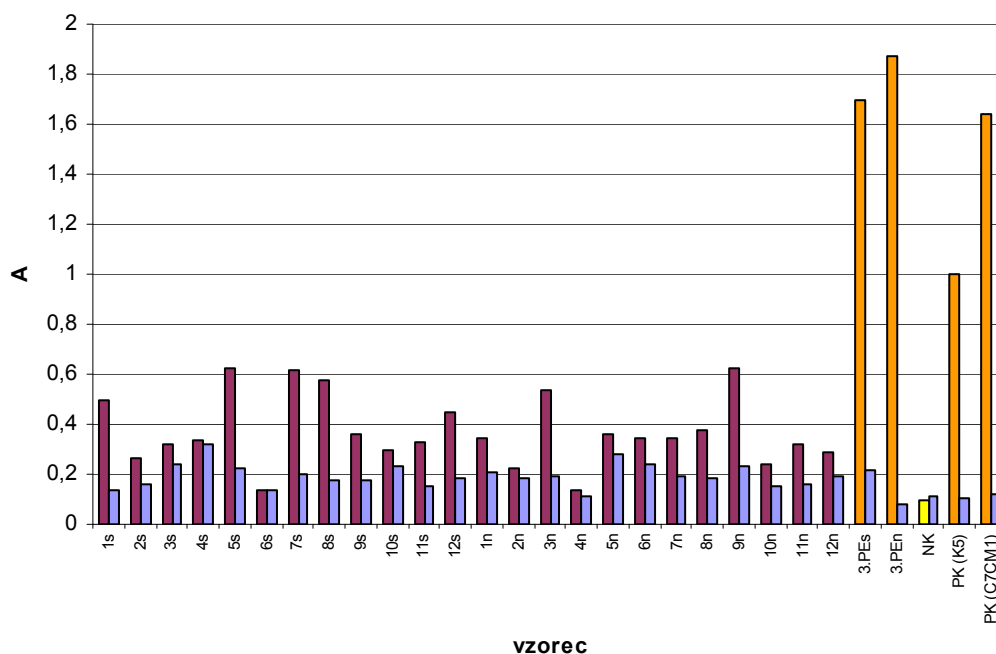
Slika 10: Rezultati testa ELISA vezave pomnoženih eluatov selekcij iz knjižnice Ph.D.-7TM na regijo Fc hIgG. Z vijolično so predstavljeni signali vzorcev eluatov, z modro odzivi slepih kontrol (v odsotnosti regije Fc hIgG), z rumeno signal negativne kontrole NK (interakcija klona brez inserta z regijo Fc), z oranžno pa signal pozitivne kontrole PK (interakcija klona K5 s streptavidinom).

4.1.3 Kvalitativna ocena afinitete posameznih fagnih klonov

Izvedli smo dva encimskoimunska testa, s katerima smo po zaključeni tretji selekcijski stopnji ovrednotili afiniteto izbranih bakteriofagnih klonov do tarčnega proteina (3.2.7.2). Za prvi poskus smo izbrali 12 klonov iz selekcije s specifično (1-12s) in 12 klonov iz selekcije z nespecifično elucijo vezanih fagov (1-12n) (slika 11), afiniteto vezave na fragment Fc hIgG preostalih 11 klonov iz selekcije s specifično (13-23s) in 11 klonov iz selekcije z nespecifično elucijo vezanih fagov (13-23n) pa smo ocenili z drugim testom ELISA (slika 12).

V obeh primerih smo za pozitivno kontrolo v vdolbinico adsorbirali streptavidin in nadalje uporabili zanj specifični vezalec K5. V prvem testu ELISA smo poleg klona K5 za PK v vdolbinico adsorbirali mišje mAb proti humanemu leptinu in z njim inkubirali zanj specifičen vezalec C7CM1. Visoko razmerje vrednosti absorbanc vzorca in SK pozitivnih kontrol dokazuje ustrezno izvedbo opravljenih testov ELISA. Pri obeh poskusih smo za

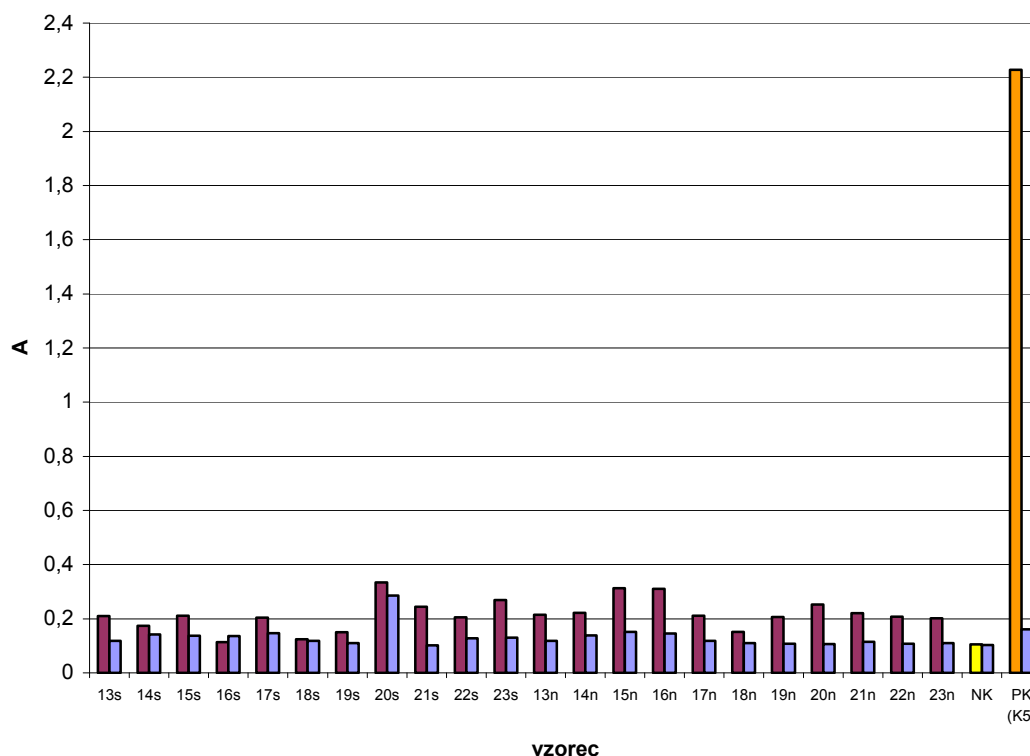
NK v vdolbinico adsorbirali fragment Fc hIgG in z njim inkubirali suspenzijo fagnega kлона brez inserta C7C3-4. Odziva vzorca in SK negativne kontrole sta v obeh primerih nizka, kar dokazuje, da se klon brez površinsko predstavljenih peptidov pri izbranih pogojih testa ne veže ne na tarčni protein ne na plastično površino vdolbinice.



Slika 11: Rezultati prvega presejalnega testa ELISA vezave izbranih bakteriofagnih klonov na fragment Fc hIgG. Z vijolično so predstavljeni signali vzorcev izbranih fagnih klonov, z modro odzivi slepih kontrol (v odsotnosti regije Fc hIgG), z rumeno signal negativne kontrole NK (interakcija kлона brez inserta z regijo Fc), z oranžno pa signali pozitivnih kontrol PK (interakcija klonov K5 oz. C7CM1 s streptavidinom oz. mišjim mAb proti humanemu leptinu in interakcija 3. pomnoženih eluatov selekcij iz knjižnice Ph.D.-7TM s fragmentom Fc).

Razmerje vrednosti izmerjenih absorbanc vzorca in SK 3. PEs ter 3. PEn je visoko, kar znova dokazuje specifično in visokoafinitetno vezavo populacije fagov 3. PE selekcije s specifičnim načinom (3. PEs) in selekcije z uporabo nespecifičnega načina (3. PEn) elucije na fragment Fc hIgG. Glede na visoki razmerji odzivov vzorca in SK 3. PEs ter 3. PEn, katerima smo bili priča že pri testu ELISA pomnoženih eluatov (4.1.2), bi pričakovali višje odzive vzorcev posameznih bakteriofagnih klonov 3. NEs in 3. NEn (klone z višjo afiniteto vezave tarčnega proteina) oz. višja razmerja vrednosti izmerjenih absorbanc vzorcev in SK fagnih klonov (klone z večjo specifičnostjo za fragment Fc), a je to lahko posledica nanašanja fagov neposredno iz gojišča ali pa težav pri pomnoževanju fagov v bakterijski kulturi in s tem nižjega titra posameznih fagnih klonov v nanosenih

vzorcih. Najvišjo afiniteto specifične vezave tarčnega proteina kaže klon 1s. V splošnem pri prvem presejalnem testu sicer opazimo višje signale vzorcev, a tudi nekoliko višje vrednosti SK, vendar pa razlika v odzivu vzorca PK enakih koncentracij klona K5 med obema testoma ELISA dokazuje, da absolutnih odzivov posameznih fagnih klonov prvega poskusa ni mogoče neposredno primerjati s signali klonov drugega testa ELISA.



Slika 12: Rezultati drugega presejalnega testa ELISA vezave izbranih bakteriofagnih klonov na fragment Fc hIgG. Z vijolično so predstavljeni signali vzorcev izbranih fagnih klonov, z modro odzivi slepih kontrol (v odsotnosti regije Fc hIgG), z rumeno signal negativne kontrole NK (interakcija klona brez inserta z regijo Fc), z oranžno pa signal pozitivne kontrole PK (interakcija klona K5 s streptavidinom).

4.1.4 Nukleotidna zaporedja insertov in ustrezajoča aminokislinska zaporedja peptidov

Osmim bakteriofagnim klonom z najvišjim razmerjem odzivov vzorca in SK v presejalnih testih, štirim iz prvega poskusa (1s, 7s, 8s, 3n) in štirim iz drugega poskusa (21s, 23s, 16n, 20n) (4.1.3), smo izolirali genomsko DNA in jim določili nukleotidna zaporedja insertov ter ustrezajoča aminokislinska zaporedja na površini predstavljenih peptidov (3.2.8). Izkazalo se je, da imamo v skupno osmih vzorcih fagne DNA predstavnike le treh klonov, ki pa na svoji površini izražajo precej podobne peptide (preglednica XII).

Bazični histidin na prvem mestu in polarni AK s hidroksilno skupino treonin ter serin na mestih 4 oz. 5 so skupne heptapeptidom, predstavljenim na vseh treh fagnih klonih. Na drugem mestu se nahajata lizin ali treonin, torej polarni AK z aminske ali hidroksilno skupino. Tretje mesto pripada nepolarni alifatski AK valinu oz. izolevcinu, ki se med seboj razlikujeta zgolj v dodatni metilni skupini izolevcina. Na šestem mestu zasledimo AK s hidroksilno skupino (serin oz. tirozin). Tirozin za razliko od serina vsebuje aromatski obroč, ki močno poveča velikost aminokislinskega ostanka. Morda je za interakcijo s tarčnim proteinom bistvena prisotnost hidroksilne skupine, medtem ko je velikost aminokislinskega ostanka za doseganje ustrezne konformacije peptida manj pomembna. Na sedmem mestu linearnega peptida se nahaja razvejana nepolarna alifatska AK levcin ali njegov strukturi izomer izolevcin. Heptapeptide torej sestavljajo večinoma polarni aminokislinski ostanki, nepolarne AK se nahajajo zgolj na mestih 3 in 7, kar nakazuje na majhno možnost interakcije peptidov z nepolarno površino polistirenskih vdolbinic.

Iz dveh plošč, ki so vsebovale približno po 100 plakov fagov 3. NEs in 3. NEn, smo pobrali skupno 46 klonov in določili nukleotidno zaporedje osmim izmed njih, fagi prav vseh osmih klonov pa na svoji površini predstavljajo peptide s precej podobnim aminokislinskim zaporedjem. Sklepamo lahko, da je fleksibilni linearni heptapeptid z aminokislinskim zaporedjem H-K/T-V/I-T-S-S/Y-I/L na površini bakteriofagnih klonov odgovoren za interakcijo s fragmentom Fc hIgG.

Zanimivo je, da se klon 1s, kateremu smo na podlagi rezultatov presejalnega testa ELISA (4.1.3) pripisali največjo afiniteto selektivne vezave tarčnega proteina, pojavlja v 3. NE razmeroma redko, saj od osmih vzorcev le eden vsebuje njegovo DNA. Tekom

seleksijskih stopenj naj bi prišlo do obogatitve fagnih klonov z največjo afiniteto in specifičnostjo do fragmenta Fc, ki naj bi se tako v 3. NE nahajali v največjem deležu. Mogoče je torej, da s tarčnim proteinom najmočneje interagira peptid HKVTSYL, saj zapis zanj nosi kar pet od osmih vzorcev fagne DNA.

Preglednica XII: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih insertov in aminokislinska zaporedja linearnih heptapeptidov, predstavljenih na površini izbranih fagnih klonov.

Klon	Nukleotidno zaporedje inserta	Aminokislinsko zaporedje predstavljenega peptida
1s	CATAAGGTTACTTCGTCTATT	HKVTSSI
7s 8s	CATACTATTACGTCTTCTATT	HTITSSI
21s 23s 3n 16n 20n	CATAAGGTGACTTCGTATCTG	HKVTSYL

4.1.5 Podrobnejše vrednotenje bakteriofagnih klonov z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo vezave regije Fc hIgG s testi ELISA

Predstavnike bakteriofagnih klonov z najvišjim razmerjem odzivov vzorca in SK v presejalnih testih (1s, 7s in 3n) smo pomnožili v večjem volumnu bakterijske kulture (3.2.6), določili titre pomnoženih klonov v pufru PBS (preglednica XIII) in klone podrobneje ovrednotili. Ocenili smo sposobnost vezave fagnih klonov na infliksimab (3.2.9.2), s tremi kvantitativnimi testi ELISA (3.2.9.3) in kompetitivno različico encimskoimunskega testa (3.2.9.4) smo ovrednotili specifičnost vezave regije Fc.

Preglednica XIII: Izmerjene absorbance in izračunani titri bakteriofagnih klonov 1s, 7s, 3n ter kontrolnega klona C7CM1 (3.2.9.1).

Klon	A ₂₆₉	A ₃₂₀	Titer (pfu/mL)
1s	0,408	0,020	3,2 · 10 ¹³
7s	0,305	0,007	2,5 · 10 ¹³
3n	0,306	0,020	2,4 · 10 ¹³
C7CM1	0,464	0,006	3,8 · 10 ¹³

4.1.5.1 Kvalitativna ocena afinitete fagnih klonov do humane regije Fc infliksimaba

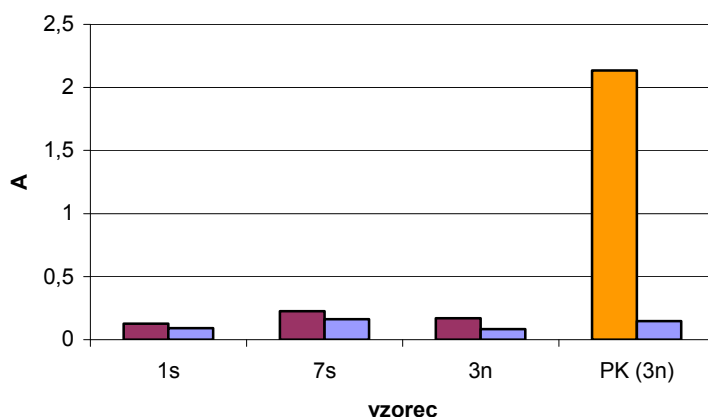
Sposobnost nastanka specifične interakcije med bakteriofagnimi kloni 1s, 7s ali 3n in infliksimabom smo preverili z encimskoimunskim testom (3.2.9.2). Rezultate poskusa prikazuje slika 13. Za pozitivno kontrolo smo v vdolbinico adsorbirali fragment Fc hIgG in nadalje z njim inkubirali fagni klon 3n. Visoko razmerje med odzivoma vzorca in SK pozitivne kontrole znova dokazuje specifičnost interakcije klona 3n z regijo Fc in ustrezno izvedbo opravljenega testa ELISA.

Odzivi vzorcev klonov 1s, 7s in 3n se nesignifikantno razlikujejo od vrednosti absorbanc SK, kar kaže na odsotnost interakcije posameznih fagnih klonov s humano regijo Fc himernega protitelesa infliksimaba. Zakaj so fagni kloni sposobni vezave same regije Fc, s fragmentom Fc infliksimaba pa ne interagirajo, lahko razložimo na več načinov. Mogoče so vezavna mesta za peptidne ligande na regiji Fc infliksimaba v veliki meri zakrita, dostop peptidov, predstavljenih na površini velikega fagnega delca, do vezavnih mest in s tem interakcija faga z učinkovino pa močno otežena. Linearni heptapeptidi, odgovorni za interakcijo bakteriofagov z regijo Fc hIgG, so predstavljeni na vseh petih kopijah kapsidnega proteina pIII. V primeru, da je visokoafinitetna vezava faga z regijo Fc posledica interakcije večih peptidnih verig z vezavnimi mesti na fragmentu Fc, opisana situacija onemogoča večvalentno interakcijo bakteriofaga z adsorbiranimi molekulami infliksimaba, fagi so tako prisiljeni z regijo Fc interagirati zgolj z nekaj izmed petih peptidnih verig, avidnost interakcije pa je prenizka, da bi kljub spiranju fagi ostali vezani na tarčno molekulo. V primeru, da se vezavna mesta za peptide nahajajo ravno na delu regije Fc, na katerega sta v molekuli infliksimaba pripeta fragmenta Fab, je vezava faga na infliksimab nemogoča.

Tekom selekcije uporabljena raztopina tarčnega proteina je najverjetneje vsebovala fragmente Fc različnih podrazredov humanega IgG (70). Mogoče je, da so peptidi, predstavljeni na površini posameznega fagnega klona, sposobni interakcije z regijo Fc le enega ali zgolj nekaterih izmed štirih podrazredov hIgG, a ne s fragmentom Fc hIgG₁, katerega vsebuje infliksimab.

V afinitetni selekciji uporabljen tarčni protein je bil tekom postopka izolacije očiščen s pomočjo različnih kromatografskih metod, najverjetneje tudi z afinitetno kromatografijo

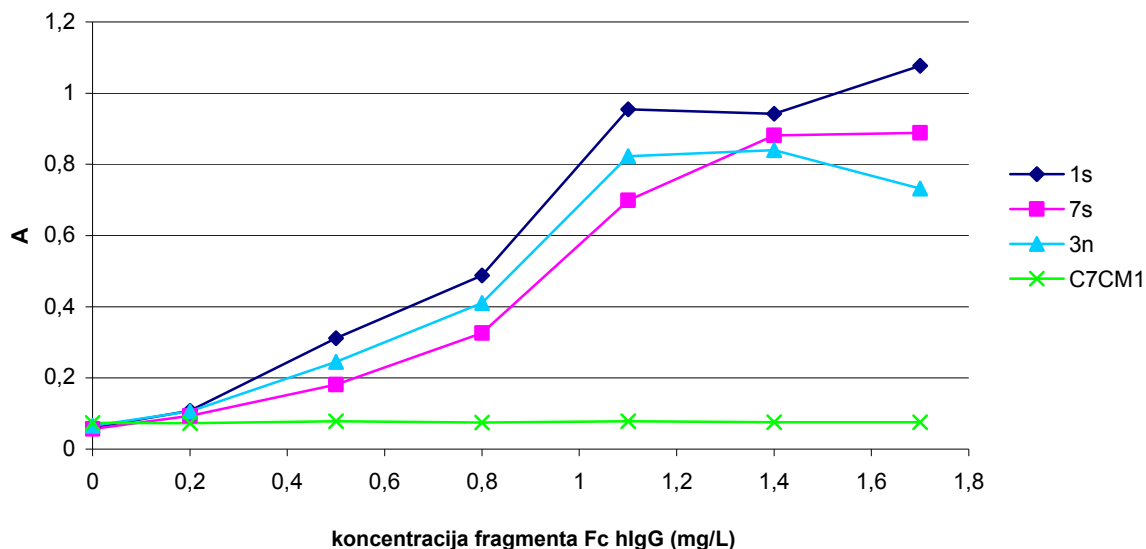
na proteina A (70), katera zahteva uporabo kislih raztopin za elucijo vezanega produkta. Sicer zelo malo, a vendarle je verjetno, da je izpostavljenost nizkemu pH povzročila konformacijsko spremembo fragmenta Fc hIgG, česar proizvajalec s končnimi testi preizkušanja produkta ni ugotovil, mi pa smo tako tekom afinitetne selekcije iz knjižnice izolirali fage z afiniteto do delno denaturiranega tarčnega proteina, kot se je zgodilo tudi Sakamotu in sodelavcem (35). Izolirani peptidi tako običajne konformacije regije Fc, torej tudi fragmenta Fc infliksimaba, ne bi prepoznali.



Slika 13: Rezultati testa ELISA vezave bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n na infliksimab. Z vijolično so predstavljeni signali vzorcev izbranih fagnih klonov, z modro odzivi slepih kontrol (v odsotnosti regije Fc hIgG), z oranžno pa signal pozitivne kontrole PK (interakcija klona 3n s fragmentom Fc hIgG).

4.1.5.2 Vrednotenje specifičnosti fagnih klonov s kvantitativnimi testi ELISA

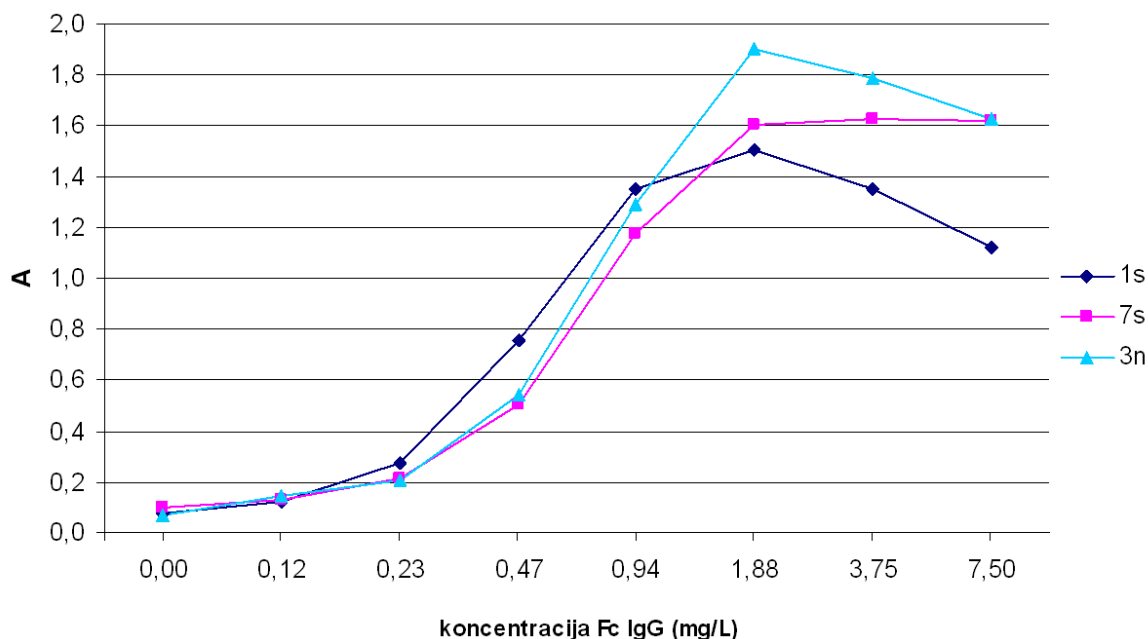
Specifičnost vezave fagnih klonov 1s, 7s in 3n na regijo Fc smo ovrednotili s tremi kvantitativnimi testi ELISA (3.2.9.3). Pri prvem poskusu smo nad različnimi površinskimi gostotami adsorbiranega tarčnega proteina inkubirali enako število fagov posameznih klonov. Odzivi bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n so med seboj primerljivi in naraščajo skladno z naraščajočimi koncentracijami tarčnega proteina, medtem ko se signal kontrolnega klona C7CM1, na površini katerega so predstavljeni peptidi, strukturno nesorodni peptidom na klonih 1s, 7s in 3n, z naraščajočo količino adsorbiranega fragmenta Fc signifikantno ne spreminja. Nizke so tudi vrednosti absorbanč slepih kontrol, pri katerih tarčnega proteina v vdolbinice nismo adsorbirali, kar zavrača možnost interakcije bakteriofagov s površinami mikrotitrne ploščice. Rezultati testa torej kažejo na selektivno vezavo fagnih klonov 1s, 7s in 3n na regijo Fc hIgG (slika 14).



Slika 14: Rezultati kvantitativnega encimskoimunskega testa vezave bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n ter kontrolnega klona C7CM1 na fragment Fc hIgG z uporabljenimi koncentracijami tarčnega proteina 0-1,7 mg/L.

Obnašanje klonov pri višjih koncentracijah fragmenta Fc hIgG (višja vrednost absorbance klona 1s, približno enaka vrednost klona 7s in nižja vrednost, ki jo opazimo pri klonu 3n, pri koncentraciji tarče 1,7 mg/L napram vrednosti absorbance pri koncentraciji tarče 1,4 mg/L) (slika 14) smo poskušali razjasniti s pomočjo drugega testa ELISA, kjer smo zopet različne količine adsorbiranega fragmenta Fc hIgG v vdolbnicah izpostavili enakemu številu fagov klonov 1s, 7s in 3n. Tokrat smo za imobilizacijo tarčnih proteinov uporabili raztopine s koncentracijami regije Fc hIgG 0-7,5 mg/L.

Odzivi bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n so med seboj primerljivi in naraščajo skladno z naraščajočimi koncentracijami tarčnega proteina do točke, kjer smo v vdolbinice nanašali raztopino tarče s koncentracijo 1,88 mg/L. Nizki so odzivi slepih kontrol, kar znova zavrača možnost interakcije bakteriofagov s plastičnimi površinami mikrotitrne ploščice. Rezultati testa torej potrjujejo selektivno vezavo klonov 1s, 7s in 3n na regijo Fc hIgG (slika 15).



Slika 15: Rezultati kvantitativnega encimskoimunskega testa vezave bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n na fragment Fc hIgG z uporabljenimi koncentracijami tarčnega proteina 0-7,5 mg/L. Zaradi boljše preglednosti so vrednosti na vodoravni osi predstavljene v logaritemski skali.

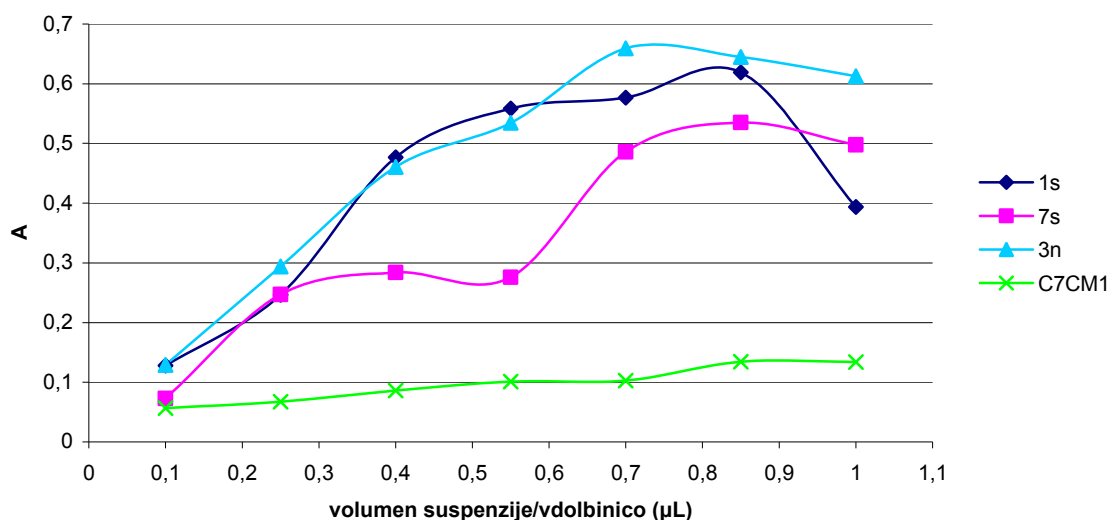
Pričakovali bi, da se odzivi vzorcev z večanjem količine adsorbiranega tarčnega proteina v vdolbinici višajo vse dokler površinska gostota fragmenta Fc še narašča (tj. dokler vdolbinica ni popolnoma prekrita s tarčno molekulo), nato pa dosežejo plato. V našem primeru ob uporabi raztopin tarčnega proteina višjih koncentracij (3,75 in 7,5 mg/L) zasledimo padec vrednosti absorbanca (slika 15). Za opažen fenomen ponujamo naslednjo razlago. Pri adsorpciji tarčnega proteina iz raztopin visokih koncentracij lahko prihaja do medsebojnega prekrivanja molekul na omejeni površini vdolbinice mikrotitrne ploščice. Vezavna mesta za peptidne ligande so zaradi naključne orientacije tarčne molekule delno zakrita, otežen je tudi dostop peptidov, predstavljenih na velikem bakteriofagnem delcu, do vezavnih mest, kar manjša možnost interakcije faga s tarčno molekulo in posledično vodi v nižji izmerjen odziv. Kot smo že omenili, so peptidi, odgovorni za interakcijo bakteriofagov z regijo Fc hIgG, predstavljeni na vseh petih kopijah kapsidnega proteina pIII. Vendar opisana situacija onemogoča večvalentno interakcijo bakteriofaga z adsorbiranimi molekulami Fc. Znižana avidnost interakcije bi tako lahko bila odgovorna za navidezno slabšo vezavo fagov pri višji površinski gostoti tarčne molekule.

Selektivnost interakcije bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n s fragmentom Fc hIgG smo potrdili tudi s tretjim encimskoimunskim testom, pri katerem smo nad enako količino imobiliziranih molekul tarčnega proteina inkubirali suspenzije naraščajočih fagnih titrov posameznih klonov. Odzivi vzorcev bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n z naraščajočimi koncentracijami fagov naraščajo do točke dodatka 1 μL oz. dodatka 0,85 μL osnovne suspenzije fagnega klona 1s in 7s oz. 3n v pufru PBS. Signal kontrolnega klona C7CM1 z naraščajočimi koncentracijami fagov narašča le minimalno. Pri dodatku 0,55 μL osnovne suspenzije fagnega klona 7s v pufru PBS opazimo odstopanje točke od trendne krivulje, vzrok kateremu je najverjetneje človeška napaka pri eksperimentalnem delu (slika 16).

Naraščanje odzivov vzorcev klonov 1s in 3n je primerljivo, medtem ko višanje vrednosti absorbanca klona 7s z naraščajočimi koncentracijami fagov za klonoma 1s in 3n nekoliko zaostaja, kar morebiti nakazuje na malenkost nižjo afiniteto vezave klona 7s na regijo Fc v primerjavi s preostalima klonoma (slika 16). Da do fragmenta Fc najvišjo afiniteto izkazuje klon 1s, sledita pa mu klona 3n in 7s, v večji meri nakazujeta predhodno izvedena kvantitativna encimskoimunska testa (slika 14, slika 15), a poraja se vprašanje ali so tako majhne razlike v odzivih vzorcev sploh signifikantne in s tem afinitete fagnih klonov 1s, 7s in 3n do tarčnega proteina značilno različne.

Pričakovali bi, da se z večanjem števila bakteriofagov v vdolbinici z adsorbirano določeno količino tarčnega proteina signal veča do neke mejne koncentracije bakteriofagov, pri kateri pride do zasedbe vseh vezavnih mest na fragmentih Fc hIgG, in da odzivi vzorcev suspenzij, ki mejni fagni titer presegajo, predstavljajo plato krivulje. V našem primeru pri vzorcih z višjimi koncentracijami fagov posameznih klonov (dodatek 1 μL oz. dodatek 0,85 μL osnovne suspenzije klonov 1s in 7s oz. 3n v pufru PBS) opazimo trend upadanja krivulje (slika 16). Ponovno lahko pojav skušamo razložiti z vplivom dejavnika avidnosti. Kot rečeno je mogoče, da je visokoafinitetna vezava faga s tarčo dejansko posledica interakcije večvalentnega liganda, torej večih peptidnih verig z vezavnimi mesti na fragmentu Fc. Pri visoki koncentraciji bakteriofagov v vdolbinici prihaja med njimi do kompeticije za vezavo na omejeno število tarčnih molekul, drug drugega pri vezavi močno ovirajo. Zato so nekateri fagi morebiti prisiljeni z regijo Fc interagirati zgolj z nekaj izmed petih peptidnih verig, celokupna jakost vezave tarčne molekule je tako manjša in šibko vezane fage v koraku spiranja odstranimo iz vdolbinic, odziv vzorca pa je posledično nižji.

Manj verjetno je, da je za interakcijo faga z vezavnim mestom na regiji Fc hIgG potrebnih vseh pet sicer fleksibilnih heptapeptidov na ustreznih medsebojnih razdaljah, ki skupaj dosegajo ustrezno konformacijo, prostorsko komplementarno vezavnemu mestu na fragmentu Fc. V primeru visokih koncentracij fagov je doseganje ustrezne konformacije zaradi medsebojnega oviranja fagov oteženo in posledično so odzivi takšnih vzorcev nižji.



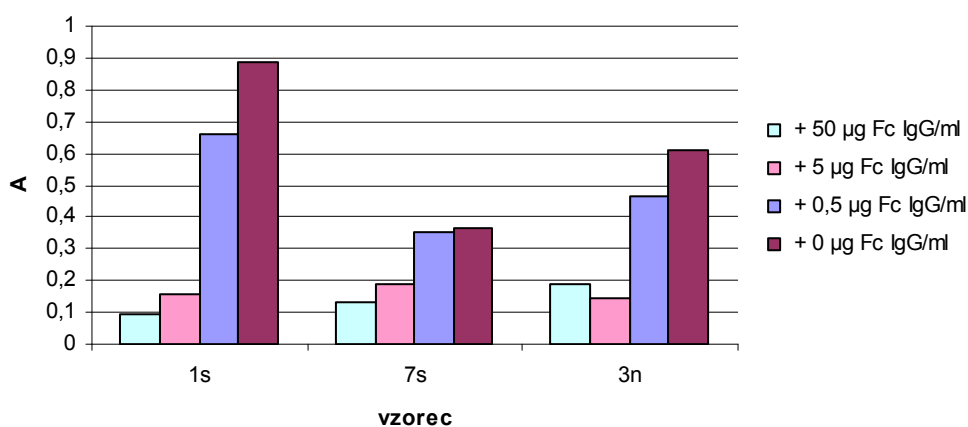
Slika 16: Rezultati kvantitativnega encimskoimunskega testa vezave bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n ter kontrolnega klona C7CM1 na regijo Fc hIgG z uporabljenimi suspenzijami naraščajočih koncentracij fagov, tj. suspenzij z naraščajočimi dodatki osnovne suspenzije posameznih fagnih klonov v pufru PBS.

4.1.5.3 Kompetitivni test ELISA vezave bakteriofagnih klonov

Specifičnost vezave bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n na fragment Fc hIgG smo dodatno ovrednotili s kompetitivnim encimskoimunskim testom. Nad enakimi količinami adsorbiranega tarčnega proteina smo inkubirali suspenzije enakega titra posameznih fagnih klonov z dodatkom naraščajočih koncentracij topne regije Fc (3.2.9.4). Na površino mikrotitrne ploščice imobiliziran fragment Fc tekmuje s prostim fragmentom v raztopini za vezavo na peptide, izražene na površini bakteriofagov, kar se kaže v padajočem odzivu vzorcev z naraščanjem koncentracije prostega tarčnega proteina v suspenziji posameznega fagnega klona.

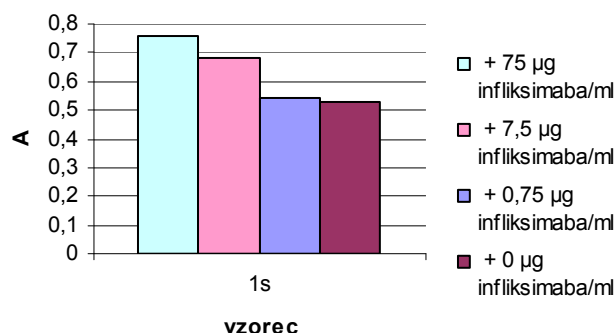
Glede na rezultate testa bi izpostavili klon 1s, saj se je med preizkušanimi ligandi izkazal za najselektivnejšega vezalca. Trend naraščanja odziva vzorcev z manjšanjem količine dodanega tarčnega proteina je značilen tudi za klon 7s, a odziv narašča precej

manj v primerjavi s klonom 1s in se v primeru, ko fragmenta Fc v suspenzijo fagov nismo dodali, nesignifikantno razlikuje od signala predhodnega vzorca. Za specifičen ligand regije Fc hIgG bi lahko označili tudi klon 3n, saj odziv vzorcev imenovanega klona s padajočimi koncentracijami dodanega tarčnega proteina narašča, čeprav signal ob dodatku 0,5 µg fragmenta Fc v suspenzijo fagov odstopa, kar pa je lahko posledica napake pri eksperimentalnem delu ali pri merjenju absorbanc, saj je padec odziva z manjšanjem količine proste tarče minimalen. Najvišjo afiniteto vezave tarčnega proteina zopet izkazuje fagni klon 1s, sledita mu klona 3n in 7s (slika 17), a da bi to lahko zanesljivo trdili, bi poskus morali večkrat ponoviti.



Slika 17: Rezultati kompetitivnega testa ELISA vezave bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n na regijo Fc hIgG.


Hkrati z vrednotenjem specifičnosti interakcije bakteriofagnih klonov 1s, 7s in 3n s fragmentom Fc, smo s kompetitivnim testom znova preverili sposobnost specifične vezave peptidov, predstavljenih na fagnem klonu 1s, z infliksimabom (3.2.9.4). Rezultati testa so zaradi preglednosti predstavljeni na ločeni sliki (slika 18). Z naraščanjem koncentracije infliksimaba v suspenziji fagnega klona odziv vzorcev celo nekoliko narašča, a so opažene razlike med absorbancami najverjetneje nesignifikantne, lahko so posledica minimalnega časovnega zamika v koraku dodajanja substrata ali H₂SO₄ posameznim vzorcem oz. neenaki optični poti pri merjenju absorbance. Rezultati testa torej potrjujejo nezmožnost interakcije fagnega klona 1s s humano regijo Fc himernega protitelesa infliksimaba.



Slika 18: Rezultati kompetitivnega testa ELISA vezave bakteriofagnega klonu 1s na regijo Fc infliksimaba.

4.1.6 Kvalitativno vrednotenje vezave sinteznega peptida na humano regijo Fc z “imunoprecipitacijo” in sledečim testom točkovnega nanosa (ang. dot blot)

S testom, analognim imunoprecipitaciji (vezavo regij Fc hIgG na biotiniliran sintezni peptid in sledečim zajetjem kompleksov na paramagnetne kroglice, prekrte s streptavidinom), ter naknadno detekcijo eluirane regije Fc, adsorbirane na nitrocelulozno membrano, s konjugatom anti-Fc hIgG-HRP (3.2.10), smo potrdili sposobnost vezave sinteznega peptida p3n na regijo Fc hIgG. Rezultate eksperimenta prikazuje slika 19. Prisotnost signala A dokazuje nastanek kompleksa biotiniliran peptid p3n-regija Fc in njegovo vezavo na streptavidinske kroglice. Po aminokislinskem zaporedju peptidu, predstavljenem na fagnem klonu 3n, enak sintezni peptid p3n, kljub izgubi učinka avidnosti (peptid HKVTSYL je namreč predstavljen na vseh petih kopijah kapsidnega proteina pIII fagnega klonu 3n, v primeru vezave večvalentnega liganda je interakcija klonu s tarčno molekulo lahko močno ojačana) ohranja opazno afiniteto do tarčnega proteina. Odsotnost signala v primeru slepega vzorca (slika 19B) zavrača možnost nespecifične vezave regije Fc na streptavidinske kroglice. Glede na opaženo prisotnost signalov C in D ter odsotnost signala E lahko zaključimo, da pri izbranih pogojih s testom lahko zaznamo vsaj 10 ng tarčnega proteina, omenjena signala pozitivnih kontrol in odsotnost signala negativne kontrole F pa dokazujejo ustrezno izvedbo opravljenega eksperimenta.

A	B	C	D	E	F
					

Slika 19: Rezultati testa “imunoprecipitacije” regije Fc hIgG s sinteznim peptidom p3n in detekcije eluirane regije Fc s konjugatom anti-Fc hIgG-HRP v testu točkovega nanosa. A) eluat iz paramagnetnih streptavidinskih kroglic po zajetju kompleksa Fc-p3n; B) slepi vzorec (eluat iz paramagnetnih kroglic, inkubiranih le z regijo Fc – v odsotnosti peptida p3n); C) neposreden nanos 100 ng regije Fc; D) neposreden nanos 10 ng regije Fc; E) neposreden nanos 1 ng regije Fc; F) neposreden nanos 300 ng papaina.

5 SKLEP

Afinitetna selekcija iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice naključnih cikličnih heptapeptidov ni bila uspešna, medtem ko smo iz knjižnice naključnih linearnih heptapeptidov preko treh selekcijskih stopenj poiskali ligande humane regije Fc. O uspešno izvedeni selekciji pričata iz stopnje v stopnjo selekcije močno naraščajoč odstotek elucije in visoka afiniteta ter specifičnost vezave populacije fagov posameznih pomnoženih eluatov na fragment Fc hIgG.

Interakcijo izbranih rekombinantnih bakteriofagov s tarčnim proteinom smo ovrednotili s prirejenima encimskoimunskima testoma. Osmim fagnim klonom z ocenjeno najvišjo afiniteto in selektivnostjo vezave regije Fc smo določili nukleotidna zaporedja insertov in njim ustrezajoča aminokislinska zaporedja predstavljenih peptidov. Izkazalo se je, da imamo v skupno osmih vzorcih fagne DNA predstavnik le treh klonov, ki pa na svoji površini izražajo precej podobne peptide. Linearni heptapeptid z aminokislinskim zaporedjem H-K/T-V/I-T-S-S/Y-I/L na površini bakteriofagnih klonov je najverjetneje odgovoren za interakcijo z regijo Fc hIgG.

Specifičnost vezave na fragment Fc izbranih fagnih klonov smo potrdili: a) s tremi kvantitativnimi testi ELISA, pri dveh smo nad različnimi površinskimi gostotami adsorbiranega tarčnega proteina inkubirali enako število fagov posameznih klonov, pri enem pa smo nad enako količino imobiliziranih molekul regije Fc inkubirali suspenzije različnih titrov posameznih fagnih klonov; b) s kompetitivno različico testa ELISA, pri katerem smo vzorcem dodajali različne koncentracije topne regije Fc. Glede na izvedene eksperimente najvišjo afiniteto vezave tarčnega proteina izkazuje fagni klon 1s, sledita mu klona 3n in 7s, a da bi to lahko zanesljivo trdili, bi bilo potrebno opraviti več ponovitev testov.

Rezultati kvalitativnega in kompetitivnega testa ELISA nakazujejo, da s humano regijo Fc infliksimaba, himernega protitelesa IgG₁, izbrani fagni kloni ne interagirajo. Smiselno bi bilo preizkusiti ali so peptidi, predstavljeni na površini fagnih klonov, sposobni vezave humane regije Fc drugih podrazredov imunoglobulinov (IgG₂, IgG₃ in IgG₄). Lahko bi preverili tudi, ali so vezavna mesta za peptidne ligande na fragmentu Fc intaktnega protitelesa zakrita (t.j. ali se morebiti nahajajo na delu regije Fc, na katerega sta v molekuli infliksimaba pripeta fragmenta Fab) in je zato vezava izbranih fagnih klonov na

infliksima onemogočena. Molekule infliksimaba bi cepili s papainom in fragmente po cepitvi adsorbirali v vdolbinico mikrotitrne plošče za nadaljnjo potencialno detekcijo z izbranimi fagnimi kloni. V primeru pozitivnega rezultata poskusa bi lahko začeli razmišljati o aplikaciji po aminokislinskem zaporedju ustrežajočih sinteznih peptidov kot specifičnih ligandov za izolacijo fragmentov Fc iz zmesi celih protiteles, fragmentov Fc in Fab. Dobro bi bilo tudi preizkusiti ali morebiti majhni sintezni peptidi vendarle dostopajo do vezavnih mest na molekuli infliksimaba in so v nasprotju z velikimi fagnimi delci sposobni vezave nanje.

Z "imunoprecipitacijo" in sledečim testom točkovnega nanosa smo potrdili, da peptid p3n, ki je po aminokislinskem zaporedju enak peptidu, predstavljenem na izbranem fagnem klonu 3n, kljub izgubi učinka avidnosti ohranja afiniteto do humane regije Fc. V prihodnje bi bilo smiselno interakcijo sinteznega peptida z regijo Fc kvantitativno ovrednotiti in preizkusiti ali je sintezni peptid kot ligand, imobiliziran na nosilcu afinitetne kolone, sposoben specifične vezave regije Fc.

Visoko specifičen peptidni ligand humane regije Fc IgG bi lahko kot alternativo proteinu A uporabili pri pripravi kolon za izolacijo in čiščenje monoklonskih protiteles ter fuzijskih proteinov s humano regijo Fc z afinitetno kromatografijo. Možna aplikacija specifičnih peptidov za fragment Fc hIgG bi lahko bila tudi zmanjševanje titra imunoglobulinov v krvi bolnikov, obolelih za avtoimunskimi boleznimi, ali pacientov pred presaditvijo organov.

6 LITERATURA

1. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 47-74.
2. Obermajer N, Premzl A, Kos J: Terapevtska monoklonska protitelesa. V knjigi Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja. Urednika: Štrukelj B, Kos J, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 531-578.
3. Kim SJ, Park Y, Hong HJ: Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells* 2005; 20 (1): 17-29.
4. Pavlou AK, Belsey MJ: The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59 (3): 389-396.
5. Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256 (5517): 495-497.
6. Presta LG: Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 640-656.
7. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT: Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 6851-6855.
8. Hwang WYK, Foote J: Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 2005; 36: 3-10.
9. Almagro JC, Fransson J: Humanization of antibodies. *Front Biosci* 2008; 13: 1619-1633.
10. Lonberg N: Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1117-1125.
11. Hoogenboom HR: Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1105-1116.
12. Chapman AP: PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 531-545.
13. Gilliland LK, Walsh LA, Frewin MR, Wise M, Tone M, Hale G, Kioussis D, Waldmann H: Elimination of the immunogenicity of therapeutic antibodies. *J Immunol* 1999; 162: 3663-3671.
14. Presta LG: Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 460-470.
15. Wu A, Senter PD: Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1137-1146.

16. Dela Cruz JS, Huang TH, Penichet ML, Morrison SL: Antibody-cytokine fusion proteins: innovative weapon in the war against cancer. *Clin Exp Med* 2004; 4: 57-64.
17. Cao Y, Lam L: Bispecific antibody conjugates in therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 171-197.
18. Roopenian DC, Akilesh S: FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 715-725.
19. Holliger P, Hudson PJ: Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1126-1136.
20. Huang C: Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY™ technology. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20: 692-699.
21. Chamow SM, Ashkenazi A: Immunoadhesins: principles and applications. *Trends Biotechnol* 1996; 14: 52-60.
22. Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, Wong V, Koehler-Stec EM, Hartnett C, Pyles EA, Xu X, Daly TJ, Young MR in sodelavci: Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* 2003; 9: 47-52.
23. McGregor DP: Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 616-619.
24. Dumont JA, Low SC, Peters RT, Bitonti AJ: Monomeric Fc fusions: impact on pharmacokinetic and biological activity of protein therapeutics. *BioDrugs* 2006; 20: 151-160.
25. Roque ACA, Lowe CR, Taipa MA: Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog* 2004; 20: 639-654.
26. Lunder M: Izolacija bioloških učinkovin. V knjigi *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. izdaja. Urednika: Štrukelj B, Kos J, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 113-134.
27. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D: Downstream processing of monoclonal antibodies - Application of platform approaches. *J Chromatogr B* 2007; 848: 28-39.
28. Low D, O'Leary R, Pujar NS: Future of antibody purification. *J Chromatogr B* 2007; 848: 48-63.
29. Roque ACA, Silva CSO, Taipa MA: Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives. *J Chromatogr A* 2007; 1160: 44-55.
30. Hober S, Nord K, Linhult M: Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B* 2007; 848: 40-47.

31. Yang H: Fc-binding hexamer peptide ligands for immunoglobulin purification. Doktorska disertacija, Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, 2008: 8-34.
32. Huse K, Böhme HJ, Scholz GH: Purification of antibodies by affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2002; 51: 217-231.
33. Kolarič B: Priprava rekombinantnih analogov domene B stafilokoknega proteina A kot potencialnih inhibitorjev cisteinskih proteaz. Diplomaska naloga (mentor: prof. dr. Štrukelj B), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006.
34. Follman DK, Fahrner RL: Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A. *J Chromatogr A* 2004; 1024: 79-85.
35. Sakamoto K, Ito Y, Hatanaka T, Soni PB, Mori T, Sugimura K: Discovery and characterization of a peptide motif that specifically recognizes a non-native conformation of human IgG induced by acidic pH conditions. *J Biol Chem* 2009; 284: 9986-9993.
36. Omersel J, Žager U, Kveder T, Božič B: Alteration of antibody specificity during isolation and storage. *J Immunoassay Immunochem* 2010; 31: 45-59.
37. Bottomley SP, Sutton BJ, Gore MG: Elution of human IgG from affinity columns containing immobilised variants of protein A. *J Immunol Methods* 1995; 182: 185-192.
38. Gülich S, Uhlén M, Hober S: Protein engineering of an IgG-binding domain allows milder elution conditions during affinity chromatography. *J Biotechnol* 2000; 76: 233-244.
39. Linhult M, Gülich S, Gräslund T, Simon A, Karlsson M, Sjöberg A, Nord K, Hober S: Improving the tolerance of a protein A analogue to repeated alkaline exposures using a bypass mutagenesis approach. *Proteins* 2004; 55: 407-416.
40. Rönmark J, Grönlund H, Uhlén M, Nygren PA: Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2647-2655.
41. Kato K, Lian LY, Barsukov IL, Derrick JP, Kim H, Tanaka R, Yoshino A, Shiraishi M, Shimada I, Arata Y, Roberts GCK: Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. *Structure* 1995; 3: 79-85.
42. Gülich S, Linhult M, Ståhl S, Hober S: Engineering streptococcal protein G for increased alkaline stability. *Protein Eng* 2002; 15 (10): 835-842.
43. Nilson BHK, Solomon A, Björck L, Åkerström B: Protein L from *Peptostreptococcus magnus* binds to the κ light chain variable domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 2234-2239.

44. Eliasson M, Olsson A, Palmcrantz E, Wiberg K, Inganäs M, Guss B, Lindberg M, Uhlén M: Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. *J Biol Chem* 1988; 263: 4323-4327.
45. Vola R, Lombardi A, Tarditi L, Björck L, Mariani M: Recombinant proteins L and LG: efficient tools for purification of murine immunoglobulin G fragments. *J Chromatogr B* 1995; 668: 209-218.
46. Kabir S: Immunoglobulin purification by affinity chromatography using protein A mimetic ligands prepared by combinatorial chemical synthesis. *Immunol Invest* 2002; 31: 263-278.
47. Verdoliva A, Pannone F, Rossi M, Catello S, Manfredi V: Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *J Immunol Methods* 2002; 271: 77-88.
48. Ehrlich GK, Bailon P: Identification of model peptides as affinity ligands for the purification of humanized monoclonal antibodies by means of phage display. *J Biochem Biophys Methods* 2001; 49: 443-454.
49. Sandin C, Linse S, Areschoug T, Woof JM, Reinholdt J, Lindahl G: Isolation and detection of human IgA using a streptococcal IgA-binding peptide. *J Immunol* 2002; 169: 1357-1364.
50. Camperi SA, Iannucci NB, Albanesi GJ, Eberhardt MO, Etcheverrigaray M, Messeguer A, Albericio F, Cascone O: Monoclonal antibody purification by affinity chromatography with ligands derived from the screening of peptide combinatorial libraries. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 1545-1548.
51. Bellofiore P, Petronzelli F, De Martino T, Minenkova O, Bombardi V, Anastasi AM, Lindstedt R, Felici F, De Santis R, Verdoliva A: Identification and refinement of a peptide affinity ligand with unique specificity for a monoclonal anti-tenascin-C antibody by screening of a phage display library. *J Chromatogr A* 2006; 1107: 182-191.
52. Murray A, Sekowski M, Spencer DIR, Denton G, Price MR: Purification of monoclonal antibodies by epitope and mimotope affinity chromatography. *J Chromatogr A* 1997; 782: 49-54.
53. Murray A, Smith RG, Brady K, Williams S, Badley RA, Price MR: Generation and refinement of peptide mimetic ligands for paratope-specific purification of monoclonal antibodies. *Anal Biochem* 2001; 296: 9-17.
54. DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, Wells JA: Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science* 2000; 287: 1279-1283.
55. Krook M, Mosbach K, Ramström O: Novel peptides binding to the Fc-portion of immunoglobulins obtained from a combinatorial phage display peptide library. *J Immunol Methods* 1998; 221: 151-157.

56. Yang H, Gurgel PV, Carbonell RG: Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 910-918.
57. Fassina G, Ruvo M, Palombo G, Verdoliva A, Marino M: Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies. *J Biochem Biophys Methods* 2001; 49: 481-490.
58. Teng SF, Sproule K, Husain A, Lowe CR: Affinity chromatography on immobilized "biomimetic" ligands: synthesis, immobilization and chromatographic assessment of an immunoglobulin G-binding ligand. *J Chromatogr B* 2000; 740: 1-15.
59. Roque ACA, Taipa MA, Lowe CR: An artificial protein L for the purification of immunoglobulins and Fab fragments by affinity chromatography. *J Chromatogr A* 2005; 1064: 157-167.
60. Gupta G, Lowe CR: An artificial receptor for glycoproteins. *J Mol Recogn* 2004; 17: 218-235.
61. Tetala KKR, van Beek TA: Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *J Sep Sci* 2010; 33: 422-438.
62. Cronan JE: Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify and study proteins. *J Biol Chem* 1990; 265: 10327-10333.
63. Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228 (4705): 1315-1317.
64. Smith GP, Petrenko VA: Phage Display. *Chem Rev* 1997; 97: 391-410.
65. Bratkovič T: Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 749-767.
66. Russel M, Lowman HB, Clackson T: Introduction to phage biology and phage display. V knjigi *Phage display*, 1. izdaja. Urednika: Clackson T, Lowman HB, Oxford University Press, New York, 2004: 1-26.
67. Ph.D.TM Phage Display Libraries, Instruction Manual E8100S, E8101S, E8102L, E8110S, E8111L, E8120S, E8121L; Version 1.0 (9/09); New England Biolabs[®].
68. Noppe W, Plieva FM, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Tuncel M, Tuncel A, Galaev IY, Mattiasson B: Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds. *J Biotechnol* 2007; 131 (3): 293-9.
69. Noppe W, Plieva FM, Galaev IY, Vanhoorelbeke K, Mattiasson B, Deckmyn H: Immobilised peptide displaying phages as affinity ligands. Purification of lactoferrin from defatted milk. *J Chromatogr A* 2006; 1101 (1-2): 79-85.

-
70. Jackson ImmunoResearch Europe, Ltd; katalog imunoglobulinov: <http://www.jireurope.com/Catalog/chr-pure.asp>, marec 2010
 71. Lunder M, Bratkovič T, Doljak B, Kreft S, Urleb U, Štrukelj B, Plazar N: Comparison of bacterial and phage display peptide libraries in search of target-binding motif. *Appl Biochem Biotechnol* 2005; 127 (2): 125-31.
 72. Vodnik M: Iskanje peptidnih ligandov ghrelina z metodo bakteriofagnega prikaza. Diplomaska naloga (mentor: prof. dr. Štrukelj B), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009.
 73. Programska oprema Translate tool: <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>, marec 2010
 74. Določanje titra fagnih klonov: <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/AbsorptionSpectrum.doc>, junij 2010