

UTILITZACIÓ DE VECTORS D'EXPRESSIÓ EN *E.coli* PEL CLONATGE DE REGIONS VARIABLES D'ANTICOSSOS

E. Rosell, A. Gòmez, J. Piulats
Laboratori de Bioinvestigació, Merck-Igoda.

Resum

La humanització d'anticossos monoclonals murins mitjançant la creació d'anticossos quimèrics murins-humans, millora la possibilitat de que aquests puguin ser utilitzats com agents terapèutics efectius en la teràpia del càncer.

S'han clonat, després d'una amplificació per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), les regions variables corresponents a les cadenes pesants i lleugeres d'un anticòs monoclonal murí amb activitat anti-gangliòsid GD3 en vectors d'expressió en *E.coli*. Aquests vectors contenen les regions constants humanes gamma 1 i kappa 1, per tant, els bacteris produiran el fragment Fab de l'anticòs quimèric.

Introducció

Els anticossos monoclonals produïts contra determinats antigens poden ser utilitzats en teràpia contra el càncer. Els anticossos monoclonals murins presenten però alguns inconvenients com són la seva immunogenicitat (resposta anti-globulina contra l'anticòs subministrat) en humans i la seva poca capacitat, en molts casos, d'activar convenientment les funcions efectores (citotoxicitat) (1).

La producció d'anticossos humanitzats, on la part variable prové de l'anticòs murí i la part constant correspon a una immunoglobulina humana, solventa aquests problemes. A més a més, molts dels híbrids produeixen anticossos específics, però són de l'isotip menys interessant: l'IgM. La tecnologia molecular permet produir anticossos monoclonals de l'isotip que més interressi. L'IgG1 humana s'ha demostrat (2) com l'isotip més efectiu com a mitjançer de la citotoxicitat (cel.lular o activant el complement).

Les regions variables de la cadena pesant i lleugera de l'anticòs 136 2A10 han estat amplificades per PCR utilitzant "primers" específics que introdueixen llocs de restricció adients per a dur a terme el posterior clonatge en els vectors d'expressió.

Material i mètodes

Es treballà amb l'anticòs monoclonal murí anomenat 136 2A10 produït en el nostre laboratori després d'una fusió de cèl.lules de melsa de ratolí immunitzat amb les cèl.lules de

melanoma WM-164 amb la línia de mieloma murí HLI-Friendly . Aquest anticòs monoclonal, de l'isotip IgM, presentà una alta afinitat pel GD3 i una gran reactivitat contra cèl.lules de melanoma humanes.

Es preparà l'ARN (3) i l'ADnc de primera cadena (4) utilitzant un oligonucleòtid dT₁₃ com a "primer".

Es van dissenyar un conjunt de "primers" per amplificar les regions variables murines de les cadenes pesants i lleugeres. Aquests "primers" (Taula 1) van ser dissenyats per tal de que hibridessin en les regions estructurals 1 i 4 (FR1 i FR4) d'ambdues cadenes (5 i 6). Aquests oligonucleòtids van ser sintetitzats en un sintetitzador Applied Biosystems 391 i purificats mitjançant una cromatografia en fase reversa utilitzant un C₁₈.

Per a l'amplificació mitjançant la PCR, es va utilitzar una barreja de reacció de 100 µl que contenia: 0,5 o 1 µl de l'híbrid ARN-ADnc, 50 pmol de cadascun dels "primers" 3' i 5', 200 µM de cada dNTP, 10 mM Tris -HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ i 2 U de Taq polimerasa (Cetus). Les mostres es sotmeteren a 25 cicles (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) després d'una desnaturalització inicial a 98°C durant 5-10 min utilitzant un bloc tèrmic programable. Una desena part del producte de la PCR va ser analitzada en un gel al 2% d'agarosa.

| | |
|--------------------------------------|--|
| <u>"primers" cadena pesant</u> | |
| VH1BACK (22-mer) Pall: | |
| 5'- AGGT(C/G)(A/C)A(A/G)CTGCAG(C/T) | |
| AGTC(A/T)GG-3' | |
| VH1FOR2 (32-mer) Bat EII: | |
| 5'-TGAGGACGGTGCACCGTGGTCCCTGGCCCC-3' | |
| <u>"primers" cadena lleugera</u> | |
| VK2BACK (24-mer) Sao I: | |
| 5'-GACATTGAGCTGACCCAGTCTCCA-3' | |
| VKFOR (24-mer) Xho I: | |
| 5'-CCGTTTCAGCTCGAGCTTGGTCCC-3' | |

taula 1

Es van utilitzar dos vectors capaços d'expressar el fragment Fab en *E.coli* basats en el pUC 18 (7). El vector FVHD1.3II va ser dissenyat per a clonar les regions variables de les cadenes pesants, mentre que el FVKD1.3II ho va ser per a rebre les regions variables de les cadenes lleugeres (Figura 2). Els vectors contenen la seqüència pel pèptid senyal Pel B (8), un lloc de clonatge múltiple i la seqüència codificant pel fragment Fd de l'anticòs D1.3 (9 i 10). El vector per a les cadenes pesants contenia la regió constant CH1 de la gamma 1 humana (11). El vector per a les cadenes lleugeres contenia la regió constant kappa humana íntegra (12).

Els productes resultants de la PCR foren purificats i digerits exhaustivament amb els enzims adients (PstI i BstEII per als productes de la cadena pesant i SacI i XhoI per els productes de la cadena lleugera). Els productes de la PCR digerits i purificats foren clonats en els vectors que també

havien estat digerits i purificats. Els productes de la lligasa, cadenes pesants i lleugeres, van ser introduïts en cèl·lules *E. coli* TG1 per electroporació. Les dues genoteques (FVH i FvL) es van crivellar utilitzant la PCR (13). De diversos clons recombinants es va preparar el DNA plasmídic de doble cadena (14) i es va seqüenciar utilitzant el mètode de la terminació per dideoxi-nucleòtids (15).

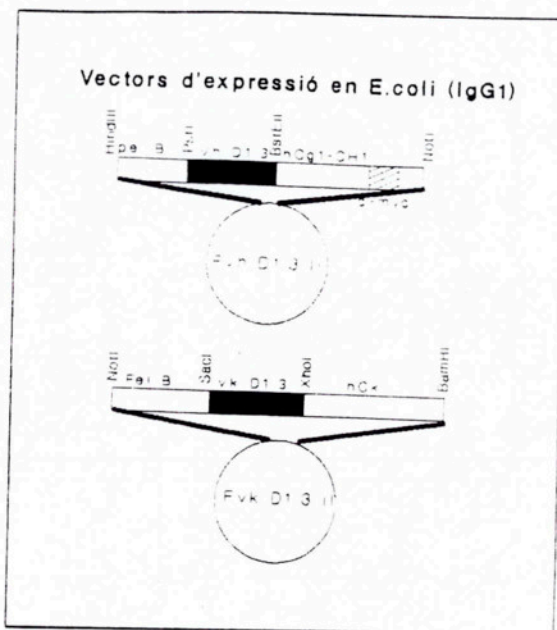


Figura 2

Resultats i discussió

La figura 4 mostra el resultat d'una amplificació mitjançant la PCR. Els productes corresponents a les regions variables van ser al voltant de 300 pb, mentre que en amplificar el fragment Fd es van obtenir bandes de 700 pb.

Figura 3: Anàlisi electroforètica dels productes de la PCR en gel d'agarosa al 2%. Carrers 1 i 11: marcador 1Kb. Carrer 2 control positiu (500 pb). Carrils 3 a 5 amplificació del fragment Fd: blanc i cadena pesant respectivament. Carrers 7 a 9 amplificació de les regions variables: blanc, cadena pesant i cadena lleugera. Carrer 10: marcador X174-HaeIII.

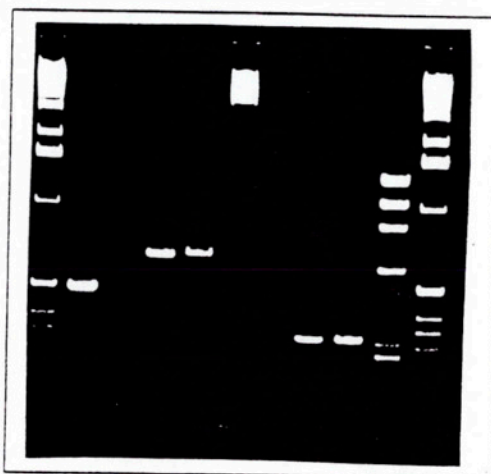


Figura 3

En la PCR, la rampa de temperatura entre els passos d'hibridació i extensió de la cadena va ser allargada fins a 2,5

seg/°C, mentre que en els altres passos del cicle el canvi de temperatura per a passar d'una a altre fou de 0.5 seg/°C. Aquest fet, juntament amb una temperatura d'hibridació elevada (60°C), millorà la fidelitat de la unió dels "primers" i disminuï els errors de la polimerasa.

Després de l'amplificació els fragments resultants van ser purificats, ja que l'exces de "primers" dificulta enormement l'activitat de les endonucleases de restricció i disminueix l'eficiència del clonatge. Així mateix, fou necessari després de les digestions tornar a purificar els productes d'interès.

L'eficiència de transformació utilitzant cèl.lules TG1 i electroporació fou de 5×10^8 . Es preparà el DNA plasmídic de diversos clons positius, seqüenciant-ne uns quants per a poder detectar possibles errors introduïts per la Taq polimerasa. Per a la cadena pesant no s'obtingué cap clon amb la seqüència completa de la regió variable, indicant la presència de dianes internes per als enzims PstI o BstEII. Per tal de clonar tota la seqüència corresponent al fragment variable de la cadena pesant, el producte de la PCR amb extrems roms fou clonat en pUC18-SmaI.

La seqüència codificant pels aminoàcids de les regions variables de les cadenes pesants i lleugeres de l'anticòs 1362A10, fou comparada amb altres regions variables murines i classificades segons Kabat (16). La regió variable de la cadena pesant correspon al grup murí IIA, presentant en les regions estructurals una elevada homologia amb les seqüències consensus. La regió variable de la cadena lleugera té l'estructura d'una cadena kappa murina del grup VI.

Bibliografia

- (1) Shawler et al., J.Immunol.,135:1530-1535, 1985
- (2) Bruggemann et al., J.Exp.Med., 166:1351-1361,1987
- (3) Chirgwin et al., Biochemistry, 18:5294-5299, 1979
- (4) Gubler and Hoffman, Gene, 25:263-265, 1983
- (5) Clackson et al., Nature, 352:624-628, 1991
- (6) Orlandi et al., PNAS.USA, 86:3833-3837,1989
- (7) Ward et al., Nature 341:544-546, 1989
- (8) Better et al., Science, 240:1041-1043,1988
- (9) Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988
- (10) Amit et al., Science, 233:747-754, 1986
- (11) Takahashi et al., Cell, 29:671-679, 1982
- (12) Rabbitts et al, Curr.Top.Microbiol.Immunol., 113:166-171, 1984
- (13) Güssow and Clackson, Nucl.Acids Res., 17:4000, 1989
- (14) Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989
- (15) Sanger et al., PNAS. USA, 74:5463-5467,1977
- (16) Kabat et al., Sequences of immunological interes, 4st edition, US Governement Printing Offices, 1987