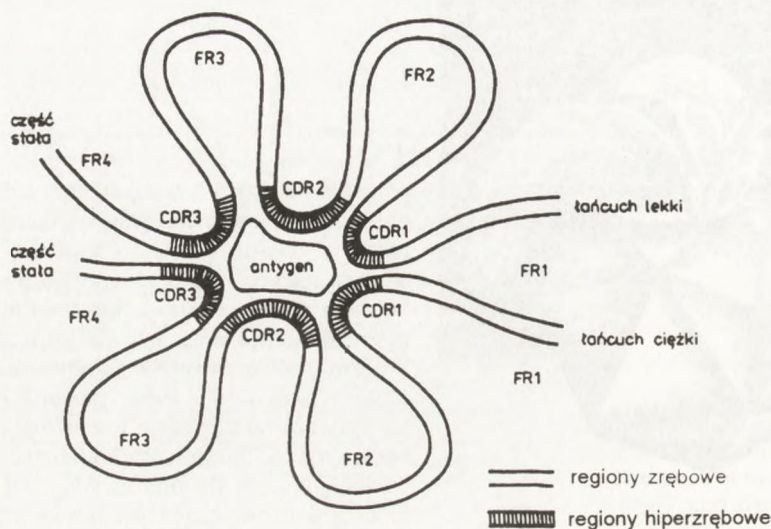




Semisyntetyczne biblioteki przeciwciał — konstrukcja i przykłady zastosowań

Rozwój genetyki molekularnej oraz coraz większe możliwości precyzyjnego inżynierowania, a także coraz doskonalsza synteza chemiczna spowodowały znaczący wzrost zainteresowania bibliotekami — układami o stosunkowo dużej liczbie porównywalnych strukturalnie i funkcjonalnie, identyfikowalnych elementów. Zbiory takie dotyczą biopolimerów (oligopeptydów, oligosacharydów czy oligonukleotydów), które początkowo tworzone były poprzez izolację już istniejących w naturalnych układach biologicznych. Obecnie większym powodzeniem cieszy się odmienna strategia prowadząca do uzyskiwania bibliotek semisyntetycznych czy w pełni chemicznych. Niewątpliwą zaletą omawianego podejścia jest możliwość poszerzenia biblioteki o nowe, nie występujące naturalnie elementy, a także możliwość interesujących funkcjonalnie modyfikacji. Zarówno chemiczne jak i biologiczne metody tworzenia bibliotek najpełniej rozwinięte i udoskonalone dla oligopeptydów (1) są obecnie opracowywane dla oligonukleotydów. Szczególnie interesującą, zarówno ze względów strukturalnych jak i funkcjonalnych, grupą peptydów są przeciwciała. Ich niezwykle specyficzne oddziaływania z określonymi determinantami antygenowymi, które są wykorzystywane w biologii molekularnej czy immunodiagnostyce klinicznej są związane z budową części zmiennych łańcuchów ciężkich i lekkich. Część zmienna — niezależnie od rodzaju łańcucha — składa się z trzech regionów hiperzmiennych i przylegających do nich czterech regionów zrębowych (ang. *frame region* — FR). Przeciwciała odmiennej swoistości różnią się sekwencją aminokwasów głównie w regionach hiperzmiennych. Regiony te determinują swoistość

przeciwiół (ang. *complementarity determining regions* — CDR), gdyż one właśnie tworzą miejsce wiązania antygeny (rys. 1) (2). Przykładowo, szczegółowe badania dotyczące wiązania przez przeciwióło mysie dużego antygeny białkowego — lizozymu jaja kurzego, wykazały, że przeciwióło kontaktuje się z antygenem poprzez 17 aminokwasów (w regionie hiperzmiennym 10 — łańcuch ciężki w większości region CDR3, 6 — łańcuch lekki oraz 1 aminokwas w regionie zrębowym) (3 – 4).



Rys. 1. Uproszczony schemat budowy przestrzennej miejsca wiążącego antygen. CDR — regiony hiperzmiennne, FR — regiony zrębowe.

Odszukanie struktur o wysokim powinowactwie do interesującej nas determinanty antygenowej, korzystając z maksymalnie dużej puli przeciwiół różniących się sekwencją części hiperzmiennych byłoby wariantem optymalnym, zapewniającym skuteczność i precyzję wyboru. Podejście takie stało się możliwe dzięki konstrukcji semisyntetycznych bibliotek przeciwiół (5 – 11).

Technologia ich generowania po raz pierwszy opublikowana przez Husa i współ. (8) jest kilkuetapowa i obejmuje kolejno:

- amplifikację jednego z regionów hiperzmiennych poprzez dobranie odpowiednich starterów o częściowo zmienianej sekwencji i reakcję łańcuchową polimerazy (PCR),
- wbudowanie zamplifikowanych fragmentów do plazmidu,
- elektroporację plazmidu do układu bakteryjnego,
- selekcję elementów biblioteki ze względu na powinowactwo do określonej determinanty antygenowej.

Etap amplifikacji dotyczyć może różnych regionów hiperzmiennych w zależności od doboru odcinków starterowych, których sekwencja w rejonie centralnym jest kombinatorycznie różnorodna. Dobrym przykładem może być tutaj amplifikacja rejonu CDR3 łańcucha ciężkiego (5), gdzie synteza odcinków primerowych obejmowała sekwencję komplementarną do regionów zrębowych FR3 (18 zasad) oraz rejon centralny o sekwencji losowej (48 zasad). Zamplifikowane sekwencje zostały wprowadzone do wektora pComb 3, zawierającego sekwencję odpowiedniego łańcucha lekkiego. Synte-

tyczny region CDR 3 reprezentowany był przez 10^{20} różnych kombinacji. Różnorodność biblioteki ograniczona była wyłącznie liczbą transformantów *E. coli* uzyskanych po wklonowaniu plazmidu, które mogły być analizowane (5×10^7 klonów). Interesujący jest również sposób przeprowadzonej selekcji klonów na drodze popularnego immunoenzymatycznego testu ELISA (ang. *enzyme linked immunosorbent assay*), który stanowi obecnie w pełni zautomatyzowaną i szybką technikę.

Innym przykładem utworzenia prezentowanego rodzaju bibliotek przeciwciał jest propozycja Burtona i współ. (6), do konstrukcji których użyto odwrotnie stranskrybowanego mRNA z limfocytów z surowic pacjentów HIV I dodatnich bez objawów chorobowych. Istotną zaletą omawianych bibliotek w kontekście technologii hybrydoma podkreślona przez Hermana Grama (7) polega na możliwości tworzenia puli przeciwciał z wyjściowych naiwnych limfocytów nie stymulowanych wcześniej do odpowiedzi immunologicznej, a zatem również nie selekcjonowanych po odpowiedzi pierwotnej. Jest to nowość w porównaniu z większością podejść genetyki molekularnej, w których aktywne przeciwciała uzyskiwane są drogą wtórnej odpowiedzi immunologicznej.

Otrzymanie semisyntetycznych bibliotek przeciwciał stanowi interesującą, możliwą do niemal całkowitej automatyzacji, technologię. Postęp w dziedzinie syntezy chemicznej umożliwiający jednoczesną syntezę wszystkich możliwych sekwencji oligomerów określonej długości (reguła dziel i łącz w wariancie 1 typ oligomeru/jedno ziarno podłoża, 12) może być bardzo obiecujący również w odniesieniu do syntezy sekwencji primerowych poprzedzającej etap amplifikacji w konstrukcji semisyntetycznych bibliotek przeciwciał. Fakt ten jest tym bardziej istotny, że dla skutecznego prowadzenia selekcji ważna jest możliwość równoczesnego jej przeprowadzenia dla wszystkich elementów biblioteki. Dzięki możliwości automatycznego sekwencjonowania — zarówno na poziomie białka jak i kwasu nukleinowego — łatwiejszy do rozwiązania jest obecnie problem odczytania wyodrębnionych struktur tworzących kompleks z interesującą nas determinantą antygenową.

Technologia konstrukcji semisyntetycznych bibliotek przeciwciał stanowi ciekawą propozycję, która zwiększyć może obszar poszukiwań o nowe, nie sprawdzone dotąd struktury.

Anna Astriab

Literatura

1. Pavia M.R., (1993), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3, 391 – 395.
2. Stainfield R.L., Kamidura M.T., Rini J.M., Profy A.T., Wilson I.A., (1993), *Structure*, 15, 83 – 93.
3. Jakóbiński M., (1993), *Immunologia*, PWN, Warszawa.
4. Roitt J., (1993), *Essential Immunology*, Blackwell Sci. Publ. Oxford.
5. Barbas III C.F., Bain J.D., Hoekstra D.M., Lerner R.A., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 4457 – 4461.
6. Burton D.R., Barbas III C.F., Perrson M.A.A., Koenig S., Chanock R.M., Lerner R.A., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 10134 – 10137.
7. Gram H., Markoni L.A., Barbas III C.F., Collet T., Lerner R.A., Kang A.S., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 3576 – 3580.
8. Huse W.D., Sastry L., Iverson S.A., Kang A.S., Altling M., Burton D.R., (1989), *Science*, 246, 1275 – 1280.
9. Orum H., Andersen P.S., Oster A., Johanes L.K., Engeberg J., (1993), *Nuclear Acids Research*, 21, 4491 – 4498.

10. Scott J.K., Smith G.P., (1990), *Science*, 249, 386 – 390.
 11. Smith G.P., (1985), *Science*, 228, 1315 – 1320.
 12. Lam K.S., Salmon E., Hersh E.M., Hruby V.J., Kaźmierski W.M., Knapp R.J., (1991), *Nature*, 354, 82 – 84.