



Limburgs Universitair Centrum
Faculteit Wetenschappen - Geneeskunde

De chimerisatie van een antilichaam gericht tegen borstkankercellen

Proefschrift voorgelegd voor het behalen van de graad van Doctor in de Biomedische
Wetenschappen aan het Limburgs Universitair Centrum te verdedigen door
ELS MEULEMANS

Promotor: Prof. dr. J. Raus
Co-promotor: Dr. C. Vandevyver

September, 1993

06

iburg

616.006
612.017

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK LIMBURG



03 04 0015722 5

931336



25 OKT. 1993



616.006

MEUL

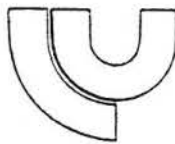
1993

u.bib.Limburg

031830

1. 1. 1.

1. 1. 1.



Limburgs Universitair Centrum
Faculteit Wetenschappen - Geneeskunde

De chimerisatie van een antilichaam gericht tegen borstkankercellen

**Proefschrift voorgelegd voor het behalen van de graad van Doctor in de
Biomedische Wetenschappen aan het Limburgs Universitair Centrum te
verdedigen door ELS MEULEMANS**

931336

leden van de jury :

prof. dr. H. Martens, voorzitter, L.U.C.
prof. dr. J. Raus, promotor, L.U.C.
dr. C. Vandevyver, co-promotor, D.W.I.
prof. dr. H. Teuchy, L.U.C.
prof. dr. G. Volckaert, K.U.L.
prof. dr. P. Holvoet, K.U.L.
prof. dr. M. Waer, Rega Instituut



25 OKT. 1993

081834

DANKWOORD

Uiteraard kon deze thesis niet verwezenlijkt worden zonder de hulp van talrijke personen. Graag zou ik hen willen bedanken voor hun inzet bij het tot stand brengen van dit proefschrift :

- Mijn familie voor de interesse die zij heeft getoond in mijn studie en werk en in het bijzonder mijn ouders voor hun ongelooflijke steun en vertrouwen.

- Prof. Dr. J. Raus, mijn promotor die mij de kans heeft geboden te doctoreren. Ik ben hem zeer dankbaar voor zijn voortdurende steun, aanmoediging en kritische visie tijdens het verloop van deze studie.

- Dr. C. Vandevyver, mijn co-promotor, voor het technisch advies en de talrijke discussies evenals de goede begeleiding doorheen dit onderzoekswerk.

- Het Limburgs Universitair Centrum dat de voltooiing van dit werk mogelijk maakte en het Dr. L. Willems Instituut waar het onderzoek verricht werd.

- Het Belgisch Werk tegen Kanker en het Limburgs Kankerfonds voor de financiële steun, het vertrouwen en de interesse die zij stelden in dit project.

- De medewerkers van het Dr. L. Willems Instituut, voor hun hulp en aanmoedigingen evenals de prettige samenwerking. In het bijzonder : Nadia Mertens, Monique Van Helvoirt, Mieke Steukers, Linda Philippaerts, Kris Motmans, Dr. H. Heyligen, Dr. Chin Yin, Dr. M.P. Jacobs, Josianne Bleus, Eddy Preboels en Johan Mathijs.

- Prof. G. Winter (MRC, Cambridge, GB) voor de verschillende vectoren die hij ter beschikking heeft gesteld, Prof. J.M. Foidart (UCL) voor de microscopische studies evenals Dr. H. Hoogenboom (CAT, Cambridge, GB) voor de leerrijke discussies en inzicht in de antilichaamtechnologie.

- De leden van de jury voor het nalezen van dit proefschrift en hun opbouwende kritiek.

- En in het bijzonder mijn lieve echtgenoot voor de grote interesse, hulp en emotionele steun voor het verwezenlijken van deze thesis, dank je Johan!

INHOUD

LIJST DER AFKORTINGEN	1
DOELSTELLING	4
HOOFDSTUK 1 : INLEIDING	6
1.1. Antilichamen	6
1.1.1. De structuur van antilichamen	
1.1.2. Antilichamen in therapie	
1.1.3. Immunotherapie van borstkanker met antilichamen	
1.2. De genetische manipulatie van antilichamen	9
1.2.1. Organisatie van de antilichaam-genen en expressiesystemen	
1.2.2. De chimere antilichamen	
1.2.3. De gehumaniseerde antilichamen	
1.2.4. Antilichaam-fragmenten	
1.2.5. Antilichaam-enzyme/toxine conjugaten	
1.2.6. De combinatie tussen antilichamen en T-cel receptoren	
1.2.7. Fusie-eiwitten	
1.3. Het 5D10 antilichaam	20
1.3.1. Inleiding	
1.3.2. Anti-tumor aktiviteit	
1.3.3. Het 5D10 antigeen	
1.4. Planning van de constructie van het chimere 5D10 antilichaam	23
HOOFDSTUK 2 : MATERIAAL EN METHODEN	25
2.1. Isolatie van RNA uit cellen	25
2.2. cDNA-Synthese	26
2.3. Gelelectroforese	26

2.4. DNA manipulaties	27
2.5. De "Polymerase Chain Reaction" (PCR)	27
2.6. De restrictie van PCR-fragmenten	28
2.7. De aanmaak en opzuivering van oligonucleotiden	29
2.8. Transformatie en transfectie van DNA in <i>E.coli</i> cellen	29
2.9. DNA-bereidingen	31
2.9.1. Kleine plasmide bereidingen	
2.9.2. Grote plasmide bereidingen	
2.9.3. Faag bereidingen	
2.10. Sequentie-analysen	32
2.11. Cellijnen	33
2.12. Celkweek	34
2.13. Electroporatie	36
2.14. "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
2.14.1. Detectie van de chimere lichte kappa keten	
2.14.2. Detectie van de chimere zware gamma 1 keten	
2.14.3. Bindingsdetectie van het chimeer antilichaam aan de MCF-7 borstkankercellen	
2.15. Eiwit-elektroforese	39
2.16. Immunoblot	40
2.17. De FACS-analyse	42
2.17.1. De "phycoerythrine" (PE) kleuring	
2.17.2. De "fluoresceïne-isothiocyanaat" (FITC) kleuring	
2.18. Proteïne A-Sepharose chromatografie	43
2.19. "Antibody dependent cellular cytotoxicity" (ADCC) test	44

HOOFDSTUK 3 : ISOLATIE EN KARAKTERISATIE VAN DE VARIABLE GEBIEDEN VAN HET 5D10 MUIS ANTILICHAAM

3.1. Inleiding	46
3.2. Isolatie van het RNA en bereiding van het mRNA	47
3.3. Bereiding van het Ig-specifiek cDNA	49

3.4. Amplificatie van het variabel gebied van de zware keten	50
3.5. Amplificatie van het variabel gebied van de lichte keten	52
3.6. Karakterisatie van het variabel gebied van de zware keten	56
3.6.1. De M13VHPCR-vector	
3.6.2. Klonering van het variabel gebied van de zware keten	
3.7. Karakterisatie van het variabel gebied van de lichte keten	59
3.7.1. De M13VKPCR1-vector	
3.7.2. Klonering van het variabel gebied van de lichte keten	
3.8. Klasse indeling van de V-gebieden	64
3.8.1. Het zware keten 5D10V _H -gen	
3.8.2. Het lichte keten 5D10V _K -gen	
3.9. Bespreking	66

HOOFDSTUK 4 : CONSTRUCTIE VAN HET MUIS/MENS CHIMEER ANTILICHAAM

4.1. Inleiding	68
4.2. De expressievector	68
4.3. De constructie van de chimere ketens	70
4.3.1. De constructie van de chimere zware keten	
4.3.2. De constructie van de chimere lichte keten	
4.4. Bespreking	76

HOOFDSTUK 5 : EXPRESSIE VAN HET MUIS/MENS CHIMEER ANTILICHAAM

5.1. Inleiding	77
5.2. Introductie van de expressie-vectoren in de myelomacellen	78
5.2.1. Transfectie van de chimere lichte keten	
5.2.2. Analyse van de chimere lichte keten transfectoma's	
5.2.3. Transfectie van de chimere zware keten	
5.3. Analyse van de expressieprodukten	83

5.3.1. Eiwit-electroforese en "immuno"blot analyse van geconcentreerd serumvrij supernatans	
5.3.2. Antigeenbindingsstudies	
5.4. Bespreking	86
 HOOFDSTUK 6 : OPZUIVERING EN SPECIFICITEIT VAN HET CHIMEER ANTILICHAAM	 88
6.1. Inleiding	88
6.2. Opzuivering van het chimeer antilichaam	88
6.3. Karaktarisatie van het opgezuiverde produkt	89
6.3.1. Eiwit-electroforese en "immuno"blot analyses	
6.3.2. Specificiteit van het chimeer antilichaam	
6.4. Biologische aktiviteit van het chimeer antilichaam	92
6.5. Bespreking	98
 HOOFDSTUK 7 : BESPREKING EN BESLUIT	 100
7.1. Amplificatie en klonering van de V-genen	100
7.2. De constructie van het muis/mens chimeer antilichaam	100
7.3. Expressie van de chimere genen	101
7.4. Bindingsaktiviteit van het chimeer antilichaam	102
7.5. Besluit	103
7.6. Opties voor verder onderzoek	104
 SAMENVATTING	 105
 REFERENTIES	 107
 CURRICULUM VITAE	 120

LIJST DER AFKORTINGEN

ADCC	"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity"
APS	Ammoniumpersulfaat
bp	Basenparen
BSA	"Bovine serum albumin"
C	Constant
cDNA	"Complementary" DNA
CDR	"Complementarity determining region"
D	"Diversity"
d.m.v.	Door middel van
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	"Deoxyribonucleic acid"
dNTP	Deoxynucleoside trifosfaat
dsDNA	"Double-stranded" DNA
DSS	"Diethyl sulfosuccinate sodium salt"
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E	"Enhancer"
EDTA	Ethyleendiamine-tetraacetaat
ELISA	"Enzyme linked immunosorbent assay"
Fab	Antigeen-bindend fragment
FACS	"Fluorescence activated cell sorter"
Fc	"Crystalline fragment"
FCS	"Fetal calf serum"
FITC	Fluoresceïne-isothiocyanaat
FR	"Framework"
Fv	Variabel fragment
g	Gram
<i>gpt</i>	Xanthine-guanine fosforibosyl transferase gen
HAMA	"Human anti-mouse antibody"
<i>hyg</i>	Hygromycine

Ig	Immunoglobuline
IL2	Interleukine 2
J	"Joining"
kDa	Kilodalton
LB	"Luria broth"
LMP	"Low melting point"
m.b.v.	Met behulp van
MEM	"Minimum essential medium"
mg	Milligram
ml	Milliliter
mM	Millimolair
nm	Nanometer
nml.	Namelijk
OPC	"Oligonucleotide purification cartridge"
OPD	Ortho-fenyleendiamine
PAA	Polyacrylamide
PAGE	Polyacrylamide-gelelektroforese
PBS	"Phosphate buffered saline"
PCR	"Polymerase chain reaction"
PE	Phyco erythrine
PEG	Polyethyleenglycol
pmol	Picomol
RNA	"Ribonucleic acid"
rpm	"Rounds per minute"
scFv	"single chain" Fv fragment
SDS	"Sodium dodecyl sulphate"
SN	Supernatans
ssDNA	"Single-stranded" DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyleendiamine
TMB	Tertramethylbenzidine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethaan

UV	Ultraviolet
V	"Variable"
V	Volt
V_H	Variabel gebied van de zware keten van een antilichaam
V_L	Variabel gebied van de lichte keten van een antilichaam
vol	Volume
μCi	Microcurie
μF	Microfarad
μg	Microgram
μl	Microliter

DOELSTELLING

Antilichamen kunnen, vooral omwille van hun specificiteit, een belangrijke rol spelen in de diagnostiek en therapie van verschillende kwaadaardige aandoeningen zoals borstkanker. Alhoewel antilichamen van dierlijke oorsprong een belangrijk hulpmiddel zijn *in vitro*, hebben ze *in vivo* om tal van redenen slechts een beperkt aantal toepassingen. Voor de *in vivo* toepassingen ware het wenselijk dat men zou kunnen gebruik maken van menselijke antilichamen. Tot hiertoe is het praktisch onmogelijk menselijke antilichamen aan te maken die gericht zijn tegen humane borstkankercellen. Vandaar dat de meeste antilichamen, die gebruikt worden bij het stellen van een diagnose of gebruikt worden in therapie, van dierlijke oorsprong zijn. Het gebruik van dierlijke antilichamen veroorzaakt in de meeste gevallen vooral bij herhaald gebruik overgevoelheidsreacties. Een elegante oplossing wordt geboden door de DNA-technologie die het mogelijk maakt domeinen van Ig-genen uit te wisselen zonder hierbij de antigeen-binding te beïnvloeden. Door antilichaam-genen te modificeren, kan men van een muizenantilichaam een minder immunogeen, meer menselijk antilichaam maken. Op deze manier kunnen enerzijds muis/mens chimere antilichamen maar anderzijds ook "gehumaniseerde" antilichamen worden aangemaakt. Bij een chimeer antilichaam zijn alleen de variabele gebieden afkomstig van een muizenantilichaam, bij het "gehumaniseerde" alleen de hypervariabele gebieden. Beide soorten antilichamen geven duidelijk minder aanleiding tot afweerreacties en daarenboven zijn ze merkkelijk efficiënter in het opwekken van secundaire immuunreacties in het menselijk immuun systeem in vergelijking met de oorspronkelijke muizenantilichamen.

Het doel van dit proefschrift is een muis/mens antilichaam te construeren dat gericht is tegen humane borstkankercellen. Na het chimeriseren van het antilichaam mag verwacht worden dat de immunogeniciteit in mensen sterk zal afnemen; de immunogeniciteit zal beperkt blijven tot een anti-idiotypereactie (Brüggemann e.a., 1989). Bovendien kan men door gebruik te maken van een humaan IgG1 de natuurlijk gemedieerde cellyse in het menselijk lichaam versterken (Bindon e.a., 1988).

In het Dr. L. Willems-Instituut werden antilichamen gemaakt gericht tegen de humane borstkankercellijn MCF-7. Het doel van het voorgelegde onderzoekswerk is één

van de geïsoleerde antilichamen, 5D10 (IgG3) genoemd te chimeriseren. Dit antilichaam herkent een tumor-geassocieerd antigeen op de MCF-7 borstkankercellijn (Plessers e.a., 1986). Uit een *in vitro* toxiciteitstest voor humane borstkankercellen blijkt dat de toxiciteit van het antilichaam voor de kankercellen toeneemt naarmate de concentratie aan antilichaam stijgt. De analyse van de binding van 5D10 aan borstkankerweefsel van patiënten duidt erop dat de binding sterk is gecorreleerd met de kwaadaardigheid (aneuploidie) van de kanker (Chin e.a., 1991).

HOOFDSTUK 1 : INLEIDING

1.1. Antilichamen

1.1.1. De structuur van antilichamen

De immunoglobulinen of antilichamen zijn een groep van glycoproteïnen die voorkomen in het serum en andere biologische vloeistoffen van alle mammalia. De productie ervan wordt geïnduceerd als het lymfoïd systeem van de gastheer in contact komt met lichaamsvreemde stoffen (antigenen). Bij de hogere mammalia kan men vijf klassen van immunoglobulinen onderscheiden : IgG, IgA, IgM, IgD en IgE. Ze verschillen onderling in lengte, grootte, aminozuur- en carbohydraat-samenstelling.

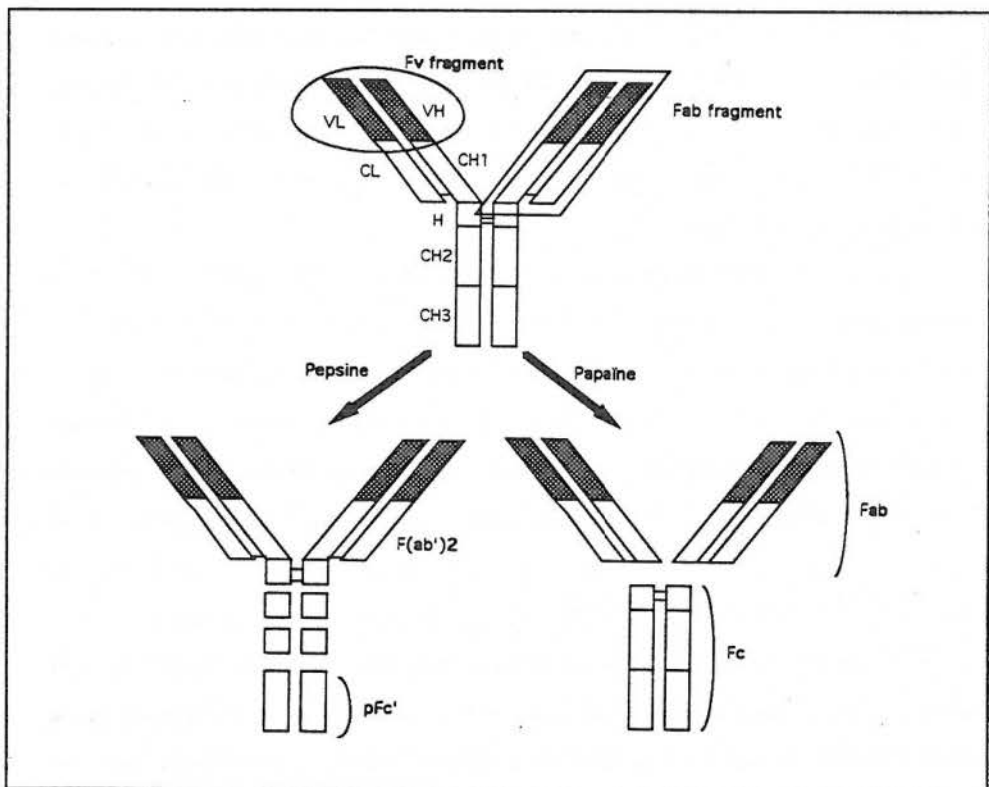
De basisstructuur van alle immunoglobulinen bestaat uit twee identieke lichte en twee identieke zware polypeptide ketens die met elkaar verbonden zijn door disulfide-bridgen. De klasse en subklasse van een immunoglobuline wordt bepaald door het type van de zware keten. Elke keten is opgebouwd uit meerdere fundamenteel gelijkvormige domeinen. Deze domeinen hebben ofwel een constant (C) ofwel een variabele (V) aminozuursequentie (zie figuur 1.1.).

Idiotypen worden gekarakteriseerd door unieke V_H - en V_L -gebieden die samen het variabel fragment (Fv) vormen. Het Fv-fragment is de kern van het antigeenbindend fragment (Fab) waarvan telkens twee gelijke kopijen in één antilichaam voorkomen. Het andere deel van het antilichaam bestaat enkel uit constante domeinen. Zij vormen een kristaliseerbaar fragment (Fc) dat de klasse of subklasse en dus ook de effector-functies van het antilichaam definieert (zie figuur 1.1.). Een antilichaam gericht tegen een cel- of weefselantigeen kan met haar Fc-gedeelte interageren met het complement of met Fc receptoren op effectorcellen en op deze wijze de targetcellen vernietigen.

De variabele gebieden die de specificiteit van het antilichaam bepalen bestaan uit duidelijk te onderscheiden deelgebieden. Men heeft enerzijds de hypervariabele gebieden of complementariteit-determinerende regio's (CDR) en anderzijds de constante "framework" gebieden (FR). Het zijn vooral de CDR's die instaan voor de binding van het antigeen, terwijl de FR het geraamte vormen met als belangrijkste de positionering

van de CDR's. Op basis van de "framework"-homologie kan men de variabele gebieden indelen in klassen (Kabat e.a., 1987).

Figuur 1.1. : De structuur van een antilichaam. Een antilichaam is opgebouwd uit 2 identieke zware en lichte ketens die worden samengehouden door zwavelbruggen. Het amino-terminale uiteinde wordt gekarakteriseerd door variabele sequenties zowel in de lichte (V_L) als zware keten (V_H). De rest van het molecuul heeft een relatief constante structuur (C). Het constante gebied van de lichte keten wordt weergegeven door C_L , het constante gebied van de zware keten is opgedeeld in 3 regio's : CH1, CH2 en CH3. Het scharnierende gedeelte of het "hinge" gebied is weergegeven door H. Door middel van enzymen kan een immunoglobuline in fragmenten gescheiden worden. Papaïne splitst een antilichaam in twee gelijkaardige Fab-fragmenten en één Fc-fragment, pepsine daarentegen levert het $F(ab')_2$ -fragment, een pFc'-fragment en laag moleculaire eiwitten.



1.1.2. Antilichamen in therapie

Mammalia produceren na immunisatie een hele variëteit van antilichamen met verschillende affiniteiten en specificiteiten voor het desbetreffende antigeen. Alhoewel deze polyklonale antilichamen vele toepassingen kenden, beperkte de heterogeniteit van deze antilichamen sterk de mogelijkheden op onderzoeks- en therapeutisch vlak. Dankzij de hybridoma-technologie (Köhler en Milstein, 1975) werd het mogelijk monoclonale antilichamen met gewenste specificiteit te selecteren. Het probleem van de beperkte leefbaarheid van lymfocyten die een gewenste antistof aanmaken, kan men door middel van een celfusie met myelomacellen (kankerlymfocyten) oplossen. Hierdoor ontstaat een hybride cel (hybridoma) die de antilichamen met gewenste specificiteit produceert en die bovendien als het ware onsterfelijk is door het verworven tumoraalkarakter.

Immunoglobulinen zijn van groot belang in het biologisch onderzoek en spelen een belangrijke rol in medische en industriële applicaties. Het gebruik van mens-vreemde antilichamen wordt echter gelimiteerd door de immunogeniciteit van deze eiwitten (Schroff e.a., 1985). Dankzij genetische manipulatie kan men bepaalde veranderingen in de aminozuur-samenstelling van de antilichamen aanbrengen, waardoor deze immunogeniciteit sterk vermindert.

1.1.3. Immunotherapie van borstkanker met antilichamen

Heelkunde, chemotherapie en radiotherapie zijn de meest voorkomende behandelingswijzen voor borstkanker. Alhoewel de continue verbetering van deze drie behandelingen geleid heeft tot een betere levensverwachting van borstkankerpatiënten, blijkt er toch geen afdoend therapeutisch antwoord te bestaan voor heel wat kankerpatiënten.

Door de spectaculaire vooruitgang in de immunologie werd een goed inzicht verkregen in de werking van het natuurlijk afweermecanisme van de mens en de structuur en functie van de immunoglobulinen. Hieruit is gebleken dat het immuunsysteem in staat is kankercellen te herkennen en aan te vallen. Zo ontstonden

immuuntherapieën die gericht zijn op een specifieke vernietiging van de tumorcellen. Men onderscheidt twee vormen van immuuntherapie :

1. De actieve immuuntherapie waarbij het immuunsysteem van de patiënt geactiveerd wordt zoals TIL-therapie (Tumor Infiltrating Lymphocytes) en LAK-therapie (Lymphokine Activated Killer Cells), de effectorcellen worden na activatie terug aan de patiënt toegediend.
2. De passieve immuuntherapie waarbij monoclonale antilichamen, specifiek gericht tegen borstkankercellen, worden toegediend aan de patiënt en regressie en eventueel vernietiging van de tumor bekomen wordt. Monoclonale antilichamen worden eveneens gebruikt als "carriers" van geneesmiddelen, natuurlijke toxines en radionucleotiden.

Het gebruik van muis monoclonale antilichamen in de kanker-immuuntherapie, houdt enige beperkingen in zoals de ontwikkeling van humane anti-muis antilichamen door de patiënt wat hun therapeutisch effect en toepassingen reduceert (Dillman, 1990). Met de bedoeling nieuwe reagentia te ontwikkelen voor kanker-immuuntherapie werden met behulp van de DNA technologie chimere en gehumaniseerde antilichamen gemaakt gericht tegen tumor-geassocieerde antigenen (Sahagan e.a., 1986; Riechmann e.a., 1988; Orlandi e.a., 1992). Enkele van deze antilichamen werden reeds aan kankerpatiënten toegediend waarbij een reductie van de HAMA respons en een langer halfwaarde-tijd werd bekomen (Hale e.a., 1988; LoBuglio e.a., 1989).

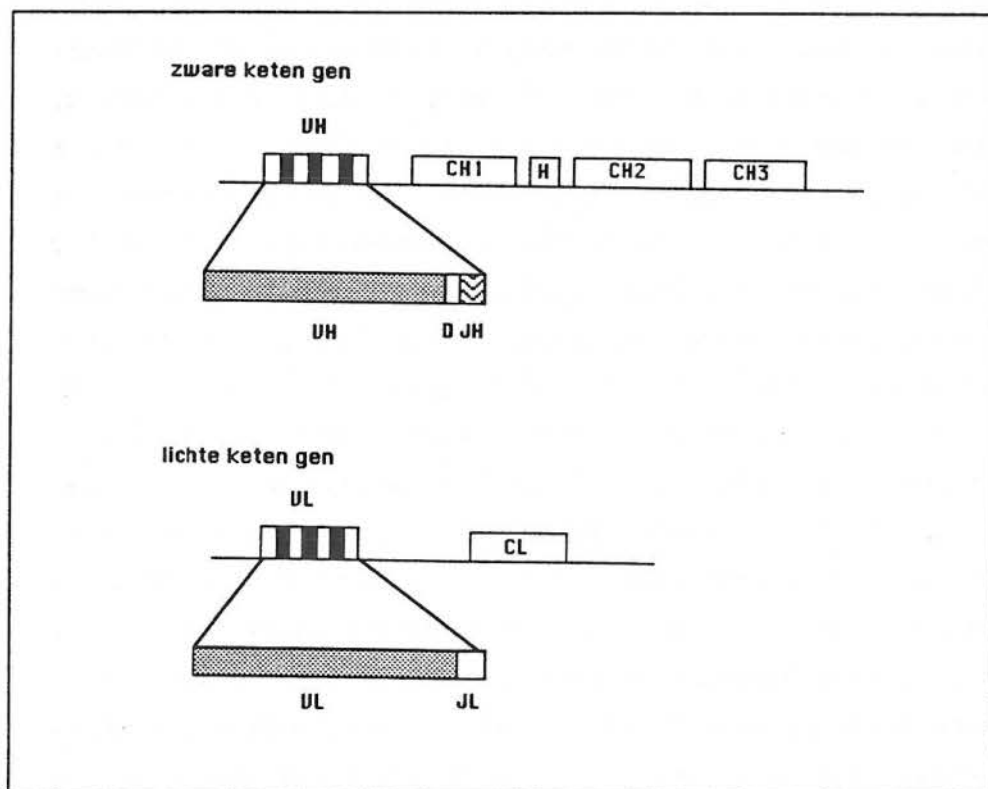
1.2 . De genetische manipulatie van antilichamen

1.2.1. Organisatie van de antilichaam-genen en expressiesystemen

De immunoglobulinen van ons lichaam herkennen en onderscheiden een enorme variëteit aan antigenen. Hoe de genetische informatie, nodig voor deze grote variëteit aan antilichamen opgeslagen is in het genoom, bleef lang een raadsel. Door de ontdekking van de restrictieënzymen en de vooruitgang van de recombinant DNA-technologie kreeg men een beter inzicht in de immunoglobuline-genetica. Een immunoglobuline keten wordt gecodeerd door verscheidene gensegmenten die verspreid liggen op de chromosomen van de kiemlijncellen. Deze genen moeten een herschikking

ondergaan om een actief immunoglobuline-gen te vormen. In de genomische DNA sequenties die coderen voor de variabele (V) en constante (C) gebieden, treft men één enkel C-gensegment aan dat codeert voor het C-gebied, en meerdere gensegmenten die coderen voor het V-gebied. Ieder variabel gebied van de lichte keten (V_L) wordt gecodeerd door twee gensegmenten namelijk het V-("Variable") en J-("Joining") segment. Ieder variabel gebied van de zware keten (V_H) wordt gecodeerd door een DNA sequentie bestaande uit een V-, J- en een D- ("Diversity") gensegment (zie figuur 1.2.). Het grote aantal V-, J- en D-segmenten dat beschikbaar is voor de codering van een immunoglobuline streng geeft aanleiding tot de enorme antilichaamdiversiteit.

Figuur 1.2. : Schematische voorstelling van de Ig-genen. Het zware keten gebied wordt gecodeerd door drie gensegmenten : een V-, D- en J-gebied; naast het lichte keten gebied dat gecodeerd wordt door twee gensegmenten : V en J.



In het immunoglobuline-gen bevinden zich achteréenvolgens promotor, signaalpeptide sequentie, een klein intron, variabel gebied, een groot intron met de Ig-"enhancer" en een constant gebied. De promotorsequentie drijft de transcriptie. Het transcriptie-sigitaal wordt versterkt door een "enhancer" gelegen in het intron tussen het V- en C-gebied. De signaalpeptide-sequentie is verantwoordelijk voor het transport van het antilichaam doorheen het membraan en het endoplasmatisch reticulum gedurende de translatie.

De DNA gemedieerde transfectie en immunoglobuline-gen expressie opent een nieuwe weg voor de studie van de Ig-functies en voor de produktie van Ig en op Ig gelijkende eiwitten (Morrison e.a., 1984, 1985, 1989). Vier verschillende systemen kunnen gebruikt worden voor de expressie van recombinante antilichaam-moleculen : bacteriën, gisten, baculovirussen en zoogdiercellen. De produktie van antilichamen via genetische manipulatie bleek echter niet zo eenvoudig te zijn. De eerste menselijke recombinante eiwitten werden geproduceerd in *E. coli* door Cabilly en medewerkers (1984). Zij probeerden zware en lichte keten genen van een muis anti-CEA antilichaam tot expressie te brengen in deze gastheer. De ketens vouwden echter niet correct op, omwille van hun beperkte oplosbaarheid en het ontbreken van de essentiële disulfidebrugvorming. Bacteriën zijn gemakkelijk op te kweken en hebben een interessant expressiesysteem voor de produktie van antilichaamfragmenten (Skerra e.a., 1988; Better e.a. 1988). Men kan echter in deze gastheer geen intacte antilichamen tot expressie brengen en de geproduceerde eiwitten zijn eveneens niet geglycosyleerd. Deze glycosylatie staat in voor een belangrijk deel van de functie van het eiwit. Gisten en baculovirussen glycosyleren hun genprodukten wel en kunnen gehele antilichaam-fragmenten tot expressie brengen (Horwitz e.a., 1988; Hasemann e.a. 1990). Expressiesystemen van zoogdieren kunnen volledig functionele antilichamen leveren. Deze geproduceerde antilichamen gelijken het meest op de menselijke antilichamen, ze bevatten alle effectorfuncties en vertonen een gereduceerde immunogeniciteit. Een probleem echter bij expressiesystemen van zoogdieren is de lage produktie. Voor de transfectie van de Ig-genen in zoogdiercellen, heeft men vectoren nodig die voorzien zijn van dominant werkende genetische merkers voor de selectie van stabiele getranfecteerde cellen (Mulligan en Berg, 1981; Davies en Jiminez, 1980, Wigler e.a., 1980; Hartman en Mulligan, 1988). De expressie verloopt via een natuurlijke "promotor" en

daarenboven beschikken de cellen over een systeem dat nodig is voor de glycosylatie en secretie van antilichamen. De vectoren bezitten eveneens een weefsel-specifieke "enhancer" die de expressie van de Ig-genen stimuleert. De meest gebruikte zoogdiercellen zijn de niet-producerende myeloma cellijnen P3X63.Ag8.653 en SP2/0, en de ovariumcellen van de chinese hamster (CHO).

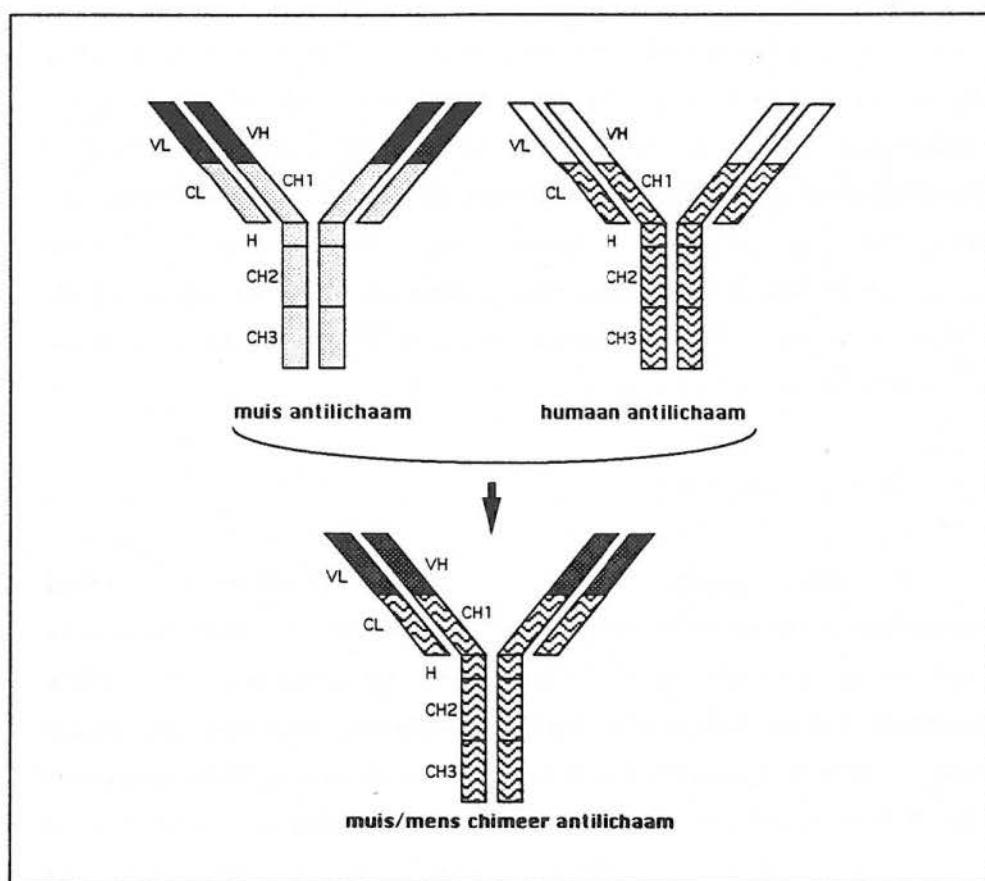
Aanvankelijk werden de variabele genen geïsoleerd door genomische kloneringen in de bacteriophage λ of het gebruik van cDNA-banken. Beide methoden hebben echter een aantal nadelen zodat meestal de "Polymerase Chain Reaction" (PCR) (Saiki e.a., 1987) gebruikt wordt voor het isoleren en tot expressie brengen van de variabele gebieden. Voor specifieke amplificatie van variabele gebieden kan men gebruikmaken van primer oligonucleotiden die binden in het constante gebied en in het eerste "framework" gebied van het antilichaam (Orlandi e.a., 1989; Gavilondo e.a., 1990; Le Boeuf e.a., 1989) of in de "leader" sequentie (Gavilondo e.a. 1990; Larrick e.a., 1989). Zo werden verschillende expressievectoren ontwikkeld om deze PCR-produkten in mammalia cellen tot expressie te brengen (Xiang e.a., 1990; Hasting e.a., 1991) of in *E. coli* cellen (Chaudhary e.a., 1990; Skerra e.a., 1991).

1.2.2. De chimere antilichamen

Vele monoclonalen die in therapie worden gebruikt zijn van dierlijke oorsprong en veroorzaken in vele gevallen ernstige overgevoelighedsreacties. Niettegenstaande de hybridoma-technologie is het moeilijk stabiele menselijke hybridoma's aan te maken. Door de genetische manipulatie is het mogelijk antilichaamgenen te modificeren en kan men van een muis antilichaam een minder immunogeen en meer menselijk antilichaam maken (Winter en Milstein, 1991). Hierbij worden de genen die coderen voor de variabele gebieden van het muis antilichaam, gekoppeld aan de genen coderend voor humane constante gebieden. Expressie in een myelomacel, levert dan een chimeer antilichaam op, waarbij chimeer betrekking heeft op gedeeltelijk "humaan" en gedeeltelijk "niet-humaan" (figuur 1.3.). Deze antilichamen zullen logischerwijs minder immunogeen zijn bij gebruik in humane therapie dan de oorspronkelijke muis of rat antilichamen. Alleen de variabele gebieden kunnen nog een immuunrespons oproepen. Bovendien kan men de klasse van het constant domein kiezen, afhankelijk van de

toepassing. Voor het opbouwen van een tumor-specifiek bindend antilichaam, dat de lyse van de tumorcellen moet veroorzaken, is de humane IgG1-subklasse het meest geschikt (Brüggemann e.a., 1987; Bindon e.a., 1988).

Voor de produktie van gemodificeerde antilichamen werd pionierswerk verricht door Sharon e.a. (1984). Zij toonden aan dat een variabel gebied van een anti-azophenylarsenaat antilichaam functioneel blijft, zelfs indien het gekoppeld wordt aan een polypeptide dat verschillend is van het eigen constant gebied.



Figuur 1.3. : Voorstelling van een muis/mens chimeer antilichaam waarbij de variabele gebieden van een muis antilichaam (V_H en V_L) gekoppeld worden aan de constante gebieden van een humaan antilichaam (C_H en C_L).

Deze auteurs maakten een chimeer gen $V_H C_K$ en introduceerden het in een cellijn die alleen nog de chimere lichte keten produceerde, dit resulteerde in de secretie van een antigeenbindend dimerisch molecule.

Op basis van deze en andere studies bleek het mogelijk constante domeinen van Ig-genen uit te wisselen, zonder de antigeen-binding te beïnvloeden. De weg van de chimere antilichamen was hiermee geopend (Morrison e.a., 1984; Boulianne e.a., 1984). Enkele van de reeds geconstrueerde chimere antilichamen worden weergegeven in tabel 1 (pag. 15-16). De bindingsspecificiteit en farmacokinetische eigenschappen van chimere antilichamen zijn meestal gelijk aan deze van de oorspronkelijke monoclonale antilichamen (Colcher e.a., 1989).

1.2.3. De gehumaniseerde antilichamen

In de antilichaam-therapie is het van belang de immunogeniciteit van de gebruikte antilichamen te limiteren. Het gebruik van chimere antilichamen voldoet hier gedeeltelijk aan, alhoewel de variabele gebieden nog een immuunrespons kunnen oproepen (Brüggemann e.a., 1989).

"Humanisatie" van antilichamen is een nieuwe techniek om deze antigeniciteit van de variabele gebieden te minimaliseren. Een eerste demonstratie werd gegeven door Jones e.a. (1986) waarbij de hypervariabele gebieden (CDR) van een humaan antilichaam werden vervangen door deze van een muis antilichaam (B1-8) gericht tegen het hapteen NP-cap. Hierbij moet men rekening houden dat de "framework" gebieden de CDR's in de juiste oriëntatie houden en soms deelnemen aan de antigeen-binding. De minste wijziging die wordt aangebracht in deze "framework" gebieden, kan een verandering van de affiniteit van het antilichaam veroorzaken (Xiang e.a., 1991). Dit gehumaniseerde antilichaam is zoals een chimeer antilichaam meer effectief voor indirecte lyse van de targetcellen.

Deze techniek werd door meerdere auteurs gebruikt. Verhoeyen en medewerkers (1988) transplanteerden een antigeen-bindingsplaats voor lysozyme, van een muis naar een mens antilichaam.

Tabel 1 : Lijst van enkele chimere antilichamen gericht tegen verscheidene antigenen

Specificiteit	Isotype	Expressie-systeem	Referentie
1. "Common acute lymphocytic leukemia antigeen (cALLA)"	IgG1	P3X63.Ag8.653	Nishimura e.a., 1987 Saga e.a., 1991
2. Antigeen op humane carcinoma cellen	IgG1	SP2/0	Sahagan e.a., 1986 Brown e.a., 1987
3. Menselijk carcino-embryonair antigeen (CEA)	IgG1	SP2/0 CHO P3X63.Ag8.653	Beidler e.a., 1988 Neumaier e.a., 1990 Koga e.a., 1990
4. Humane transferrine receptor	IgG1	SP2/0	Hoogenboom e.a., 1990
5. Humane α/β T-cel receptor	IgG1, IgG4	SP2/0	Shearman e.a., 1991
6. Gastrointestinaal kanker geassocieerd antigeen	IgG1	SP2/0	Sun e.a., 1987 LoBuglio e.a., 1989 Steplewski e.a., 1988
7. HIV-gp 120	IgG1	SP2/0	Li e.a., 1990
8. IL2-receptor	IgG1, IgG3 IgG1	SP2/0 SP2/0	Junghans e.a., 1990 Vandevyver e.a., 1993
9. CAMPATH-1 antigeen	IgG1,2,3,4 Y0		Riechmann e.a., 1988

Riechmann e.a. (1988) maakten het rat IgG2a antilichaam, dat gericht is tegen het CAMPATH-1 antigeen dat voorkomt op alle humane lymphocyten en monocyten, meer bruikbaar voor therapie door de CDR's van het rat antilichaam over te plaatsen naar een humaan antilichaam. Het gehumaniseerde antilichaam veroorzaakte remissie in patiënten met non-Hodgkin-lymfoma (Hale e.a., 1988). De aanmaak van het gehumaniseerd antilichaam gericht tegen de IL2-receptor (Tac) gebeurde met gesofisticeerde computerprogramma's. Het gehumaniseerde antilichaam bezat uiteindelijk één derde van de affiniteit van het oorspronkelijke muis antilichaam (Queen e.a., 1989). Met het gebruik van deze techniek werden ook twee antilichamen tegen herpes gehumaniseerd (Co e.a., 1991).

Gehumaniseerde antilichamen bezitten duidelijk een minimale antigeniciteit maar vertonen meestal een sterke affiniteitsdaling t.a.v. het oorspronkelijke muis antilichaam.

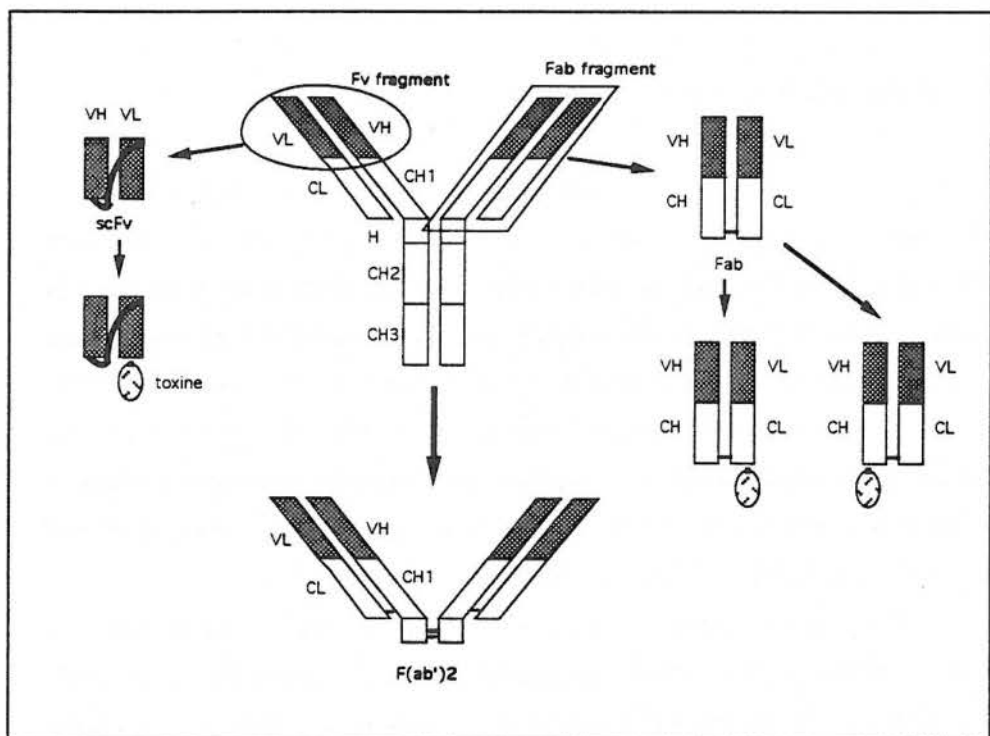
1.2.4. Antilichaam-fragmenten

Voor het gebruik van antilichamen in therapie en diagnostiek is de bindingsspecificiteit van het antilichaam van groot belang. Voor heel wat toepassingen is alleen het Fv- of Fab-gedeelte nodig en zijn de effectorfuncties soms overbodig of nadelig. Kleinere fragmenten zouden ondanks hun snellere verwijdering uit het plasma, een beter therapeutisch effect hebben. Met behulp van de recombinant-DNA-technologie is het mogelijk fragmenten van antilichamen te ontwikkelen (zie figuur 1.4.). De expressie van functioneel opgevouwde Fab-fragmenten werd reeds bekomen in dierlijke cellen (Sharon e.a., 1984) maar ook in gist (Horwitz e.a., 1988) en *E. coli* cellen (Better e.a., 1988, Plückthun e.a., 1989).

Het Fv-fragment bestaat uit het V_H - en V_L -gebied van een antilichaam en is het kleinste fragment dat de gehele bindingsplaats omvat. Skerra en Plückthun (1988) waren de eersten die een actief Fv-fragment tot expressie konden brengen in bacteriën. Analyses hebben uitgewezen dat Fv-fragmenten dezelfde bindingscapaciteiten omvatten als Fab-fragmenten maar het nadeel hebben gemakkelijk te dissociëren (Better e.a., 1988, en Plückthun e.a., 1989).

Om de stabiliteit van het Fv-fragment te verhogen werd een "single chain" Fv-fragment (scFv) ontwikkeld. Een scFv-fragment omvat een V_H - en V_L -gebied die met elkaar in verbinding staan door een peptide linker. De meeste peptide linkers bestaan uit glycine en serine residu's (Huston e.a., 1988) met soms een aantal lysines en glutamines om de oplosbaarheid van het fragment te verhogen (Bird e.a., 1988; Colcher e.a., 1990). Algemeen wordt aangenomen dat deze fragmenten dezelfde specificiteiten en affiniteiten vertonen voor hun antigenen als de oorspronkelijke antilichamen.

Figuur 1.4. : Schematische voorstelling van een antilichaam en de afgeleide antilichaamfragmenten. Fab en F(ab')₂ kunnen aangemaakt worden met enzymatische klievingen en recombinant DNA-technologie. Fv en scFv worden aangemaakt met DNA technieken



Er werd aangetoond dat scFv-fragmenten met een anti-tumoraal karakter omwille van hun kleine omvang beter kunnen doordringen in dense tumoren en een beperkte antigeniciteit vertonen in vergelijking met andere immunoglobuline vormen (Colcher e.a., 1990; Yokota e.a., 1992).

Tegenwoordig is het mogelijk antilichaamfragmenten tot expressie te brengen aan de oppervlakte van bacteriofagen. Hiervoor worden immunoglobuline variabele (V) genen uit hybridoma's of B-cellen geïsoleerd met de PCR-techniek en gekloneerd in expressievectoren. In de vector wordt het antilichaamfragment gekoppeld aan de sequentie van een faag-kapseliwit zodat het tot expressie gebracht kan worden aan de oppervlakte van de bacteriofaag (Mc Cafferty e.a., 1990; Hoogenboom e.a., 1991). De fagen die een antigeen-bindend eiwit tot expressie brengen, kunnen aangerijkt worden door affiniteitschromatografie. Op die manier is het mogelijk bibliotheken aan te leggen van antilichaam-fragmenten die een grote affiniteit voor het antigeen bezitten (Clackson e.a., 1991; Marks e.a., 1992).

1.2.5. Antilichaam-enzyme/toxine conjugaten

Door recombinante-DNA-technieken kan men gemakkelijk enzymen, toxines of andere eiwitten verbinden aan antilichamen of antilichaamfragmenten. Het belangrijkste doel is door de aanéenschakeling van een antilichaam met een niet-antilichaam een selectieve werking van het enzyme of toxine op welbepaalde cellen te krijgen.

Chaudhary en medewerkers (1990) koppelden PE40, een gemodificeerde vorm van het *Pseudomonas* exotoxine, aan het scFv-fragment van een anti-Tac antilichaam (zie figuur 1.4.). Het immunotoxine bleek toxisch te zijn voor cellen met IL2-receptoren en cellen van patiënten met T-cel leukemie (Kreitman e.a., 1990). Andere voorbeelden zijn de constructie van twee immunotoxines die gericht zijn tegen de humane transferrine receptor, enerzijds met het PE40 en anderzijds met het diphteria toxine (Chaudhary e.a., 1990; Batra e.a., 1991). Hoogenboom e.a. (1991) koppelden het TNF-cytokine aan een gemodificeerd antilichaam voor het gebruik ervan in kanker-therapie. De meest geconstrueerde immunotoxines zijn gericht tegen één receptor of antigeen maar onlangs werden zelfs bifunctionele immunotoxines ontwikkeld (Tai e.a., 1990; Batra e.a., 1990). Deze voorbeelden tonen aan dat de

antigeen bindingseigenschappen van het oorspronkelijk antilichaam behouden blijven en dat na de aanéenschakeling het toxine of enzyme functioneel blijft.

1.2.6. Combinatie tussen antilichamen en T-cel receptoren

De T-cel receptor (TcR) bestaat net zoals een antilichaam uit een lichte en een zware keten, respectievelijk een α - en een β -keten. Beide ketens worden gecodeerd door gensegmenten bestaande uit variabele en constante gebieden. De α - en β -keten vormen samen met het antigeen een MHC-bindend receptor complex op de celmembraan van T-cellen. Om T-cellen te produceren met een nieuwe antilichaam gelijkende antigeenspecificiteit werden chimere TcR-genen getransfecteerd in cytotoxische T-cel hybridoma's. Deze chimere TcR-genen bevatten de variabele gebieden van een specifiek antilichaam en de constante gensegmenten van een α of β TcR-keten. Hierdoor werden T-cellen met nieuwe specificiteiten ontwikkeld. In principe kunnen deze T-cellen specifieke effectorfuncties mediëren en prolifereren. Zo werden T-lymfocyten geproduceerd die cytotoxisch zijn voor tumorcellen of cellen geïnfecteerd met virussen (Gross e.a., 1989).

Voor de productie van een oplosbare TcR werden de variabele gebieden van een α - en β -keten gekoppeld aan de constante gebieden van een Ig-molecule (Gascoigne e.a., 1987; Mariuzza en Winter, 1989). De gewenste assemblage tussen beide ketens trad echter niet op.

1.2.7. Fusie-eiwitten

Een fusie-eiwit is een proteïne waarbij een deel van de antilichaam-sequentie vervangen wordt door de sequentie van een ander eiwit.

De fusie van deze eiwitten kan op twee manieren gebeuren :

1. Ofwel gebeurt de fusie in het constante gebied van het antilichaam waarbij het variabel gebied met de antigeen specificiteit constant blijft.
2. Ofwel gebeurt de fusie in het variabel gebied van het antilichaam waardoor de specificiteit van het antilichaam vernietigd wordt en het constante gebied en de geassocieerde effectorfuncties constant blijven.

Het produceren van biologisch actieve fusie-eiwitten hangt af van het feit of de aanééngekoppelde moleculen zich kunnen opvouwen tot actieve domeinen. Het meest gekende fusie-eiwit betreft de CD4-Ig combinatie die gebruikt kan worden voor het neutraliseren van T-cellen die geïnfecteerd zijn met het HIV-1 virus (Capon e.a., 1989; Traunecker e.a. 1989). Er werden zelfs antilichamen geconstrueerd met groeifactoren die gebruikt worden voor het localiseren van groeifactor-receptoren (Shin e.a., 1990; Gillies e.a., 1991). Landolfi (1991) verving de variabele gebieden van een Ig-molecule door IL2 waardoor specifieke lyse van IL2-receptor positieve cellen optrad in de aanwezigheid van complement.

1.3. Het 5D10 antilichaam

1.3.1. Inleiding

Een groot aantal monoclonale antilichamen die reageren met borsttumoren werden reeds beschreven in de literatuur. Deze antilichamen worden geklasseerd in vier groepen op basis van het gebruikte immunogeen voor de immunisatie :

- a. humane melkvetmembranen
- b. gestabilizeerde borsttumorcellijnen
- c. metastaserende tumorcellen
- d. hormoonreceptoren

Het gebruik van gestabilizeerde cellijnen (b) biedt het voordeel dat ze gemakkelijk beschikbaar zijn, het nadeel is dat de antigene eigenschappen in de loop van de *in vitro* cultuur kunnen wijzigen. Tegen verschillende gestabiliseerde borstkankercellijnen werden reeds monoclonale antilichamen geproduceerd. Yuan en medewerkers (1982) maakten monoclonalen tegen ZR-75-1 cellen en Dempsey en medewerkers (1986) tegen de humane borstkankercellijn PMC42. Het muis MBr1 antilichaam is gericht tegen de humane borstkankercellijn MCF-7 (Ménard e.a., 1983) en herkent een carbohydraat epitoom dat voorkomt op verschillende glyco-conjugaten (Bremer e.a., 1984; Mioti e.a. 1989). Het MBr1 antilichaam werd reeds gebruikt voor *in vitro* immunodiagnose

(Colnaghi e.a., 1987) en *in vivo* als actief immuuntoxine (Canevari e.a., 1985; Orlandi e.a., 1988). Met het vooruitzicht het antilichaam te gebruiken in therapie werd een muis/mens chimere antilichaam geconstrueerd (Orlandi e.a.; 1989). Verschillende muis antilichamen werden aangemaakt tegen cellysaten afkomstig van de humane borstkankercellijn CAMMA -1 (Liao e.a., 1987, 1989).

MCF-7 is een goed beschreven subtetraploïde humane borsttumorcellijn. De cellijn werd gestabiliseerd door Soule en medewerkers (1973) van de "Michigan Cancer Foundation" (MCF) en wordt enorm veel gebruikt voor de studie van borstkanker en voor de aanmaak van monoclonalen (Ménard e.a., 1983; Brabon e.a., 1984; Thompson e.a., 1983; White e.a., 1985; Pancino e.a., 1990).

In het Dr. L. Willems-Instituut werden antilichamen gemaakt gericht tegen de MCF-7 borstkankercellijn (Plessers e.a., 1990). Eén van de geïsoleerde antilichamen, 5D10 (klasse IgG3) genoemd, werd gekarakteriseerd en blijkt een tumor-geassocieerd antigeen te herkennen. Het 5D10 antilichaam vertoont een hoge graad van specificiteit voor epitheliale cellen. De reactie met deze cellen is echter heterogeen, het cytoplasma van borstkankercellen geeft een intensieve kleuring, terwijl voor normaal weefsel de kleuring vooral geconcentreerd voorkomt op luminale plaatsen en in secretie-producten. Het monoclonaal reageert eveneens met niet-gefixeerde cellen en met paraffine-materiaal (Plessers e.a., 1986).

Bij een onderzoek naar het invasief en metastaserend gedrag van MCF-7 cellen in een *in vitro* (embryonaal kippenhart) en een *in vivo* (naakte muis) modelsysteem was het mogelijk om met 5D10 op specifieke wijze de MCF-7 cellen te localiseren (Plessers e.a., 1988).

Vermits het onderzochte monoclonaal specifiek is voor epitheelcellen en niet reageert met lymfoïde organen of beenmerg kan het aangewend worden voor de opsporing van metastaserende epitheelcellen in lymfeknopen en beenmerg, en mogelijk eveneens voor het onderscheiden van epitheliale tumorcellen in sereuze effusies.

1.3.2. Anti-tumor aktiviteit

De volgende eigenschappen bevestigen het mogelijk gebruik van het 5D10 antilichaam in diagnose en therapie. Het 5D10 antilichaam herkent de MCF-7 borstkankercellijn die voorzien is van steroid receptoren. De *in vitro* toxiciteit van het antilichaam voor humane borstkankercellen werd gemeten in een "chromium release" test waaruit blijkt dat de vrijzetting van radioactief chromium toeneemt naarmate de concentratie aan 5D10 stijgt.

Analyse van de binding van 5D10 op borstkankerweefsel van patiënten duidt erop dat de binding sterk is gecorreleerd met de kwaadaardigheid of DNA-ploidie van de kanker. De meeste tumoren vertoonden een heterogeen kleuringspatroon. De resultaten suggeren dat er een correlatie bestaat tussen de DNA-inhoud van de nucleus en één of meerdere antigenen die herkend worden door het 5D10 antilichaam in borstkankers (Chin e.a., 1991). Er werd reeds aangetoond dat tumoren met een aneuploïde DNA-inhoud zich sneller ontwikkelen en tot een ongunstige prognose leiden, dit in tegenstelling tot tumoren met een diploïde DNA-inhoud (Auer e.a., 1984). De reaktiviteit van 5D10 tegen aneuploïde kankercellen kan een hulp zijn voor het stellen van een meer gedetailleerde prognose en diagnose van borstkankerpatiënten.

1.3.3. Het 5D10 antigeen

Voor het gebruik van het 5D10 antilichaam in therapie of diagnostiek is het wenselijk het antigeen, dat herkend wordt door het antilichaam op de MCF-7 cellen, te identificeren. Verschillende tumor-geassocieerde antigenen (TAA) werden reeds geïdentificeerd en vertegenwoordigen potentiële doelwitten voor immuuntherapie. De meest bestudeerde TAA zijn het carcino-embryonogeen antigeen (CEA) (Gold e.a., 1965) en het tumor-geassocieerd glycoproteïne-72 (TAG-72) (Colcher e.a., 1981). CEA is een glycoproteïne van 180 kDa dat tot expressie komt op een groot aantal colon-, rectale-, maag- en pancreas-tumoren, 50 % op borsttumoren en 70 % op longtumoren. Het TAG-72 is een mucine dat voorkomt op het celoppervlak van tal van tumoren. Monoclonale antilichamen tegen CEA (Sharkey e.a., 1990; Goldenberg e.a., 1990; Beatty e.a., 1990) en TAG-72 (Colcher e.a., 1987; Esteban e.a., 1987; Maguire e.a., 1989) werden reeds

gebruikt voor de lokalisatie van tumoren in patiënten. Recent werden zelfs de genen die coderen voor een aantal TAA gekloneerd (Beauchemin e.a., 1987; Rose e.a., 1986; Wreschner e.a., 1990). Deze techniek biedt een grote hulp voor het eventueel uitvoeren van immuuntherapeutische studies in een dierenmodelsysteem (Hand e.a., 1993).

Na indirecte immunofluorescentie op MCF-7 cellen werd het 5D10 antigeen gelocaliseerd in perinucleaire gebieden en aan de oppervlakte van de MCF-7 cellen. Voor de identificatie van het antigeen dat herkend wordt door het 5D10 antilichaam, werd het antigeen aangerijkt door gelfiltratie en anionuitwisselings-chromatografie en gebeurde de karakterisatie van het antigeen met biochemische en immunologische methoden (Plessers e.a., 1990; Vandevyver e.a., 1993). Het 5D10 reactieve antigeen is een heterogeen glycoproteïne met een hoog moleculair gewicht (40 tot 200 kDa) zoals werd aangetoond met SDS-PAGE en immunoblotting. Het antigeen wordt partieel vernietigd door methanol-extractie, subtilisine en pronase behandeling; en de antigenische activiteit is volledig verdwenen na perijodaat en neuraminidase behandeling. Deze resultaten veronderstellen het glycoproteïne karakter van het 5D10-antigeen en de aanwezigheid van koolhydraten zoals sialzuur in het epitoom gebied.

1.4. Planning van de constructie van het chimere 5D10 antilichaam

Vertrekkende van de 5D10 hybridomacellijn wordt het RNA geëxtraheerd en gebruikt voor eerste streng cDNA-synthese met immunoglobuline specifieke oligonucleotiden (Orlandi e.a., 1989). Met behulp van de PCR-techniek worden de genen, coderend voor de variabele gebieden van zowel de lichte (V_L) als zware keten (V_H) van het 5D10 antilichaam geïsoleerd. De geamplificeerde variabele gebieden worden overgebracht naar een M13- of PUC-vector om de sequentie-analyse van de fragmenten toe te laten. De sequenties van de gebieden worden vergeleken met de sequenties beschreven door Kabat e.a. (1987). Na de sequentie-analysen worden de fragmenten in specifieke vectoren M13VKPCR1 en M13VHPCR1 gekloneerd. Deze vectoren bevatten de expressiecassette van het antilichaam. Vervolgens wordt de expressiecassette met het variabel gebied overgebracht naar een vector die voorzien is van het gepaste constante gebied. De PSV-*gpt* vector met het humaan γ -1 gen voor de chimere zware keten en de

PSV-*hyg* vector met het humane κ -gen voor de chimere lichte keten. Beide vectoren zijn voorzien van een immunoglobuline "enhancer" en selectiegenen.

Beide chimere genen worden door opéénvolgende transfecties samengebracht in de SP2/0 cellijn. Na selectie van stabiele cellijnen worden de klonen die het chimere antilichaam produceren, via screening met een ELISA-test voor humaan IgG/ κ geïsoleerd. De chimere proteïnen worden verder geanalyseerd met behulp van SDS-PAGE en immunoblot. De chimere eiwitten worden geïsoleerd via een proteïne A affiniteitschromatografie en de antigeenbinding wordt d.m.v. FACS-analyse gekarakteriseerd. De cytotoxiciteit van het chimeer antilichaam wordt bepaald aan de hand van een "chromium release" test op MCF-7 borstkankercellen.

HOOFDSTUK 2 : MATERIAAL EN METHODEN

2.1. Isolatie van RNA uit hybridomacellen

Het RNA werd aanvankelijk geëxtraheerd uit 5×10^8 cellen met de methode beschreven door Opdenakker e.a. (1982). De cellen werden opgelost in een hypotone buffer (10 mM NaCl, 3 mM magnesiumacetaat en 20 mM Tris/HCl, pH 7,4) en na het toevoegen van lysisbuffer (hypotone buffer met 5% sucrose en 1,2 % Triton) werd het geheel gehomogeniseerd met een homogenisator. De celkernen werden verwijderd door centrifugatie (5 minuten bij 3000 rpm bij 4°C). Vervolgens werd het RNA uit het supernatans geëxtraheerd door een fenolextractie. Daarvoor werd het supernatans aangelengd met een 1/10 volume SDS (10 %) en 1,3 volume gedestilleerde fenol. Het mengsel werd al schuddend geïncubeerd gedurende 10 minuten bij 50°C. Na centrifugatie (30 minuten bij 15 000 rpm) werd de waterfase verwijderd en al schuddend geïncubeerd met 1 volume fenol/chloroform/isoamylalcohol (v/v/v : 48/48/4) gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur. Na centrifugatie (15 minuten bij 15 000 rpm bij 4°C) werd een NaCl/ethanol oplossing (1/10 volume van 1M NaCl en 2 volumes gekoelde absolute ethanol) aan de waterfase toegevoegd. Na een incubatie van tenminste 16 uur bij -20°C werd het RNA geprecipiteerd met behulp van ultracentrifugatie (30 minuten bij 4°C aan 30.000 rpm). Uit het RNA werd het mRNA geïsoleerd d.m.v. affiniteitschromatografie zoals beschreven door Aviv en Leder (1972).

Meer recent werd een eenvoudiger methode om het RNA uit cellen te extraheren beschreven door Chomczynski (1988). Op basis van deze methode werden 5×10^6 cellen gesuspenderd in 1 ml RNAzol (Biotecx laboratories, Texas, VS), na het toevoegen van 100 µl chloroform en centrifugatie van het geheel, werden twee fasen zichtbaar : een onderste fenol-chloroform fase en een bovenste waterige fase. Het RNA bevond zich in de waterige fase terwijl DNA en eiwitten in de interfase bleven. Na precipitatie van het RNA met isopropanol bij -20°C, werd het gewassen met 75 % ethanol en geresuspenderd in een 1mM EDTA oplossing. De zuiverheid en de concentratie van het RNA werden bepaald door een fractie van het staal te scheiden in

een 0,7 % agarose gel (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS) en zichtbaar te maken op een UV transilluminator m.b.v. ethidiumbromide (Boehringer, Mannheim, D) (zie 2.3.).

2.2. cDNA-synthese

Voor de synthese van cDNA werd de "Superscript" cDNA-synthese kit (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS) gebruikt. Bij gebruik van oligo-(dT)₁₂₋₁₈ als initiator van eerste streng cDNA-synthese, werd de procedure gevolgd zoals beschreven in de handleiding. Voor de initiatie van de synthese met specifieke oligonucleotiden (Levy e.a., 1987) werd de volgende methode gevolgd : het hybridiseren van de complementaire sequenties gebeurde door 5 µg RNA te incuberen met 50 pmol "primer"-oligonucleotide in een volume van 15 µl gedurende 10 minuten bij 70°C. Vervolgens werden alle componenten uit de "cDNA-synthesis kit" nodig voor de eerste streng synthese aan dit mengsel toegevoegd en werd de reactie uitgevoerd volgens de handleiding. Na de synthesesreactie werden de bekomen cDNA-fragmenten verdund in 4 volumes water en opgemengd met 1 volume fenol/chloroform/isoamylalcohol (v/v/v : 25/24/1). Na centrifugatie (2 minuten bij 13 000 rpm) werd de waterfase verwijderd en aangelengd met 1 volume chloroform/isoamylalcohol (v/v : 24 /1). Na het vermengen van de stoffen werd het mengsel gecentrifugeerd (2 minuten bij 13 000 rpm). Het cDNA werd uit de waterfase geprecipiteerd met 2 volumes ethanol en 1/10 volume 3M natriumacetaat na een incubatie van 16 uur bij -20°C. Na centrifugatie (15 minuten bij 13 000 rpm bij 4°C) werd het cDNA gewassen met 200 µl ethanol (75 %) en opgelost in 100 µl water. Het cDNA kan nu gebruikt worden voor de PCR reactie.

2.3. Gelelektroforese

Grote DNA-fragmenten werden gescheiden via gelelektroforese in 0.6 % tot 2.5 % agarosegelen (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS) in een submarien systeem met een elektroforese buffer (EB) (40 mM Tris-HCl, 33 mM natriumacetaat, 2 mM EDTA, 0.16% azijnzuur). Het DNA werd gevisualiseerd op een UV-transilluminator in de aanwezigheid van 10 µg/ml ethidiumbromide (Boehringer, Mannheim, D).

Voor de isolering van DNA-fragmenten of vectoren uit gelen werd "Low Melting Point" agarose (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS) gebruikt. Na elektroforese werd het gewenste fragment met een scalpel uit het gel gesneden en overgebracht naar een 1,5 ml Eppendorf buisje. Het fragment werd opgelost in twee volumes steriel water en 10 minuten bij 70°C geïncubeerd. Na drie fenolextracties werd het DNA gezuiverd via gelfiltratie doorheen Sefadex-G50 (PharmaciaLKB, Uppsala, S) en vervolgens geprecipiteerd met twee volumes precipitatiemix (ethanol/ isopropanol/ 3 M kaliumacetaat (v/v/v : 50/50/5)). Na centrifugatie gedurende 10 minuten bij 13 000 rpm, werd het DNA-precipitaat gedroogd in de speedvac-concentrator (Life Science International, Leuven, B) en opgelost in steriel water. Het geëluëerde stuk DNA is dan klaar voor gebruik.

2.4. DNA manipulaties

Alle manipulaties met DNA zoals restricties (endonucleasen), ligaties (T4-DNA-ligase), invulreacties (Klenow) en defosforylaties (Phosfatase, Alkaline) werden uitgevoerd zoals beschreven in de handleidingen van de firma's. De gebruikte enzymen werden aangekocht bij Boehringer (Mannheim, D) en GibcoBRL (Gaithersburg, MD, VS).

2.5. De "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

De PCR-techniek is een *in vitro* methode om specifieke DNA-sequenties enzymatisch aan te maken m.b.v. twee primers die hybridiseren op de tegenovergestelde DNA-streng en de gewenste regio flankeren. In een eerste stap worden de parentale DNA-strengen gedenuatureerd, vervolgens binden de "primer" oligonucleotiden aan het "template" DNA en worden de enkelstrengen complementair gesynthetiseerd. De cyclus herhaalt zich 30 tot 35 keer en de hoeveelheid DNA verdubbelt zich na elke cyclus. Het geamplificeerde DNA heeft een grootte die overeenstemt met het aantal nucleotiden tussen de gebruikte primers.

De PCR-techniek (Saiki e.a., 1985) heeft een enorme impact gehad op de fundamentele en diagnostische aspecten van de moleculaire biologie (Erich H.A., 1989).

Met deze techniek kan men, vertrekkende van een kleine hoeveelheid "template" (m-RNA, totaal RNA, cDNA of DNA), grote hoeveelheden van een specifiek DNA-fragment amplificeren.

Voor de amplificatie vanuit RNA werd eerst het eerste streng cDNA gesynthetiseerd zoals beschreven staat in 2.2.. Na het neerslaan van het cDNA en het wassen van de pellet met 200 µl ethanol (75 %), werd de pellet opgelost in 100 µl water en gebruikt voor de PCR-reaktie.

De amplificatie van het gewenste fragment vertrekkende van het cDNA, gebeurde met twee specifieke primers in een reaktiemengsel van 50 µl bestaande uit 250 µM dNTP, 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 % gelatine, 25 pmol van ieder "primer" oligonucleotide en 2.5 units *Thermus aquaticus* (Taq) polymerase (Cetus, Norwalk, CO) (Saiki e.a. 1988). Het reaktiemengsel werd bedekt met 2 druppels paraffine olie en onderworpen aan 35 cycli op een programmeerbare verwarmingsblok (New Brunswick, NJ, VS). Eén cyclus bestond uit 1 minuut bij 95°C (denaturatie), 1 minuut bij 55°C ("annealing") en 2 minuten bij 72°C (invulreaktie). De PCR-reaktie werd afgesloten met een finale invulreaktie van 10 minuten bij 72°C. Deze cycli werden aangehouden voor alle PCR-amplificaties. Na de amplificatie reaktie werd de paraffine olie van het PCR-mengsel verwijderd met een chloroform extractie. Vervolgens werd het geamplificeerde fragment op een 2% agarose gel geïdentificeerd. Geknipt lambda DNA (Boehringer, Mannheim, D) werd als DNA-merker gebruikt. Vermits contaminatie een groot probleem kan zijn bij deze techniek, werd een amplificatie controle ingebouwd waarbij het cDNA vervangen werd door steriel water.

2.6. De restrictie van de PCR-fragmenten

De "primer" oligonucleotiden die gebruikt werden in de PCR-reakties, werden voor de meeste amplificaties voorzien van enzymatische knipplaatsen. Na de amplificatie, werd het fragment enzymatisch geknipt in het PCR-reaktiemengsel en vervolgens gescheiden op een "low melting point agarose gel" (2.6). Na de elutie van het fragment uit het gel (2.3) werd het geligeerd in een vector en gebruikt voor transfectie in bacteriële cellen.

2.7. De aanmaak en opzuivering van oligonucleotiden

De oligonucleotiden die gebruikt werden in cDNA-synthesen, PCR-reakties en sequentie-analysen werden aangemaakt m.b.v. een DNA-synthesizer (Applied Biosystems, Californië, VS). De synthese van een oligonucleotide gebeurde als volgt : aan het 3' terminale nucleotide, dat gekoppeld is aan een vaste fase in een kolom (reactie-kamer), werden nucleotiden één voor één toegevoegd tot de primer gesynthetiseerd was. Na de synthese werd het oligonucleotide met ammonium hydroxide van de kolom gehaald en geprecipiteerd met ethanol.

Voor sommige reacties was het noodzakelijk de oligonucleotiden extra op te zuiveren. Daarvoor werd tijdens de syntheseslap een eindstandige trityl groep aan het oligonucleotide gekoppeld. Na de synthese en het elueren van het "primer" oligonucleotide, werd het op een "Oligonucleotide Purification Cartridge" (OPC) kolom (Applied Biosystems, Californië, VS) gezuiverd zoals beschreven in de handleiding.

2.8. Transformatie en transfectie van DNA in *E. coli* cellen

De bacterie-stammen die gebruikt werden voor het opkweken van plasmiden of fagen zijn :

JM110 : F', dam, dcm, supE44, hsdR17, thi, leu, rpsL, lacY, galK, galT, ara, tonA, thr, tsx, del(lac-proAB), traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZdelM15.
JM101 : F', supE, thi, del(lac-proAB), traD36, proA⁺B⁺, lacI^q, lacZdelM15
TG1 : K12, F', supE, hsdD5, thi, del(lac-proAB), traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZdelM15
HB101 : F⁻, supE44, hsdS20, leu, mtl-1, rpsL20(Sm^r), lacY1, galK2, ara-14, proA2, xyl-5, recA13, lambda⁻

Transformatie van *E.coli* met plasmide DNA (HB101) of faag DNA (JM101, JM110, TG1) gebeurde met de calciumchloride methode van Mandel en Higa (1970). Om plasmide DNA in *E. coli* te transformeren werden de bacteriën eerst competent gemaakt met CaCl_2 (100 mM). De *E. coli* werden opgekweekt tot hun exponentiële fase en vervolgens opgelost in steriele en gekoelde CaCl_2 (100 mM). Na een incubatie van 30 minuten op ijs werden de bacteriën gecentrifugeerd en geresuspendeerd in CaCl_2 aan 1/100 van het beginvolume. Na een tweede incubatie op ijs, werd de suspensie verdund in glycerol tot een eindconcentratie van 15% en uitverdeeld in 1.5 ml eppendorf buisjes. De bacteriën werden gedurende twee maanden bij -70°C bewaard.

Deze competente bacteriën werden met het te transformeren DNA 20 minuten op ijs geïncubeerd en vervolgens 5 x aan een hitte "shock" van 37°C onderworpen. Na een tweede incubatie op ijs gedurende 10 minuten, werden de getransformeerde bacteriën een uur in 2 ml LB medium (1% Bacto Trypton, 0,5% Yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, MI), 0,5% NaCl) opgegroeid. Vervolgens werd de opgegroeide cultuur gemengd met 4 ml 0.8% agar (slab agar) in de aanwezigheid van Ampicilline (50 ng/ml, Boehringer, Mannheim, D) (voor plasmiden) en uitgeplaat op een voedingsbodem (LB medium met 1,5% agar). De bodems werden overnacht in de broedstoof bij 37°C geïncubeerd.

Transfectie van bacteriën met infectieuze fagen gebeurde volgens de methode van Messing (1983). De transfectie van het faag DNA in competente bacteriën (JM101, JM110, TG1) werd op dezelfde manier uitgevoerd als voor het plasmide DNA, met dit verschil dat er slechts één hitte "shock" bij 42°C gedurende 1 minuut werd uitgevoerd. Na de hitte "shock" werden de bacteriën nog 5 minuten op ijs gehouden. Vervolgens werden ze samen met 200 μl TG1, JM101 of JM110 cellen in exponentiële fase met 4 ml slab agar gemengd en uitgeplaat op een voedingsbodem. Na één nacht incubatie bij 37°C konden de individuele plaques in de *E.coli*-monolaag onderscheiden worden.

2.9. DNA-bereidingen

2.9.1. Kleine plasmide bereiding

Voor de isolatie van het plasmide DNA uit bacteriën werd de methode gebruikt van Volckaert e.a. (1988). De kolonies werden met een steriele tip van de voedingsbodems verwijderd (2.9) en in 4 ml LB medium gesuspenseerd in de aanwezigheid van ampicilline (1 µg/ml). Vervolgens werden de LB-buisjes één nacht in het schudtoestel (New Brunswick, NJ, VS) bij 37°C geplaatst. De bacteriën uit één buisje werden gecentrifugeerd voor 10 seconden bij 13 000 rpm en na het verwijderen van het supernatans opgelost in 100 µl van een sucrose-Tris oplossing (10 % sucrose, 5 mM Tris), 5 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur en vervolgens gelyseerd met 20 µl lysozyme (10 mg/ml water). Na een incubatie van 5 minuten bij kamertemperatuur werd 120 µl CTLM oplossing (0,2 % Triton X-100, 25 mM EDTA, 25 mM CDTA, 25 mM Tris, pH 8) aan het staal toegevoegd. Na voorzichtig opmengen werden de stalen 20 minuten gecentrifugeerd. Het plasmide DNA werd verder opgezuiverd d.m.v. fenolextracties en een gelfiltratie met Sefadex G50. Het filtraat werd geprecipiteerd met 2 volumes precipitatiemix (ethanol/ isopropanol/ 3 M kaliumacetaat (v/v/v : 50/50/5)) en gedurende één nacht bij -20°C geplaatst. Vervolgens werd het staal 10 minuten gecentrifugeerd bij 13 000 rpm en werd het DNA precipitaat gedroogd in een Speedvac-concentrator. De pellet werd opgelost in steriel water en een fraktie van het staal werd gebruikt voor elektroforese op een agarose gel om de lengte van het plasmide DNA te bepalen.

2.9.2. Grote plasmide bereiding

Voor bereidingen van grote hoeveelheden plasmide DNA (100 ml culturen) werd het DNA gezuiverd m.b.v. Qiagen tips (Diagen, Düsseldorf, Duitsland) waarvan het principe berust op de alkalische-lyse-methode van Birnboim e.a. (1983). Na de opzuivering van het plasmide DNA zoals beschreven in de handleiding, werd een fractie van het DNA gecontroleerd op agarose gel. DNA afkomstig van deze bereidingen is

zeer zuiver en kan, na denaturatie van het dubbelstrengig DNA, rechtstreeks worden voor sequentie-analysen.

2.9.3. Faag bereidingen

Dubbelstrengig M13-faag DNA werd bekomen uit een faagkweek waarbij 40 µl van een verzadigde bacteriën cultuur in 4 ml LB medium werd opgelost en vervolgens werd geïnfecteerd met één faagplaque. Na 6 uur incubatie van de culturen bij 37°C in het schudtoestel (New Brunswick, NJ, VS), werd het dubbelstrengig (ds) DNA op dezelfde wijze bereid als beschreven in 2.9.1. voor plasmide DNA.

De bereiding van enkelstrengig (ss) faag DNA uit faagculturen gebeurde m.b.v. de methode beschreven door Messing (1983). Na het incuberen van de faagculturen gedurende 6 uur bij 37°C, werden de bacteriën neergeslagen door centrifugatie (5 minuten bij 13 000 rpm). Na het verwijderen van de cel-pellets, werden de fagen uit het supernatans geprecipiteerd door de stalen te incuberen met 20 % polyethyleenglycol (PEG-6000 M) met 2,5 M NaCl gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur. Het ss faag DNA werd neergeslagen door de stalen 10 minuten te centrifugeren bij 13 000 rpm. De pellet werd opgelost in 100 µl steriel water en opgezuiverd d.m.v. fenolextracties en een gelfiltratie over Sefadex G50 (Maniatis). Het filtraat werd geprecipiteerd met precipitatiemix (ethanol/ isopropanol/ 3M kaliumacetaat (v/v/v/ : 50/50/5)) en één nacht bij -20°C geplaatst. Na centrifugatie werd het DNA gedroogd in de Speedvac-concentrator en gebruikt voor sequentie-analysen en transfectie experimenten.

2.10. Sequentie-analysen

Nucleotide sequentie-analysen werden uitgevoerd met de dideoxymethode van Sanger (Sanger e.a. 1977). Voor sequentie-analysen met ss faag DNA werd gebruik gemaakt van het "T7 sequencing" systeem (PharmaciaLKB, Uppsala, S). De reacties werden uitgevoerd met 5 µg ss faag DNA dat vooraf bereid werd zoals beschreven in 2.9.3.. Als "primers" werden de universele "reverse" M13 of PUC primer gebruikt van de kit of de "FOR" primers uit de PCR-reakties.

Voor sequentie-analysen met dubbelstrengig plasmide DNA werd het "Sequenase version 2.0" systeem (USB, Cleveland, VS) gebruikt. Als template voor deze reacties werd het ds DNA vooraf bereid zoals beschreven in 2.9.2.. Vervolgens werd 5 µg van het opgezuiverde dsDNA gedenateerd met 2M NaOH/ 2mM EDTA. Na het neutraliseren van de reactie met 2M ammoniumacetaat (pH 4,6) werd het DNA met ethanol geprecipiteerd en gedurende 10 minuten in een bad met droogijs geplaatst. Vervolgens werd het staal 10 minuten gecentrifugeerd bij 13 000 rpm en na het verwijderen van het supernatans werd het DNA precipitaat gedroogd in de speedvac-concentrator. De opbrengst na denaturatie bedroeg 2-3 µg DNA. De primers die gebruikt werden in de sequentie-reakties, werden aangemaakt met de DNA-synthesizer en gezuiverd op een "OPC" kolom (2.6.).

Na het uitvoeren van de sequentie-reakties zoals beschreven in de handleiding, werden de stalen m.b.v. elektroforese gescheiden op polyacrylamide gellen (4 tot 5 % polyacrylamide, 0,25 % N,N' methyleenbisacrylamide, 42 % ureum, 90 mM Tris, 90 mM boorzuur, 2,5 mM EDTA, 0,025 % ammoniumpersulfaat (APS) en 0,1 % TEMED bij 8,3 pH). Na de elektroforese m.b.v. een vertikaal sequentie-systeem (Biorad Laboratories, Richmond, MD, VS) bij 2000 V en 150 mA werd het gel 10 minuten gefixeerd met 2% azijnzuur en nagespoeld met gedestilleerd water. Daarna werd het sequentie-gel overgebracht naar een "Whatmann" filterpapier (Vel, Leuven, B), afgedekt met plastic folie en gedroogd in een vacuum-droger (Biorad laboratories, Richmond, MD, VS) gedurende 30 minuten bij 80°C. Het visualiseren van de sequentie-gelen gebeurde met de conventionele radiografische methode met ³⁵S dATP-merking.

2.11. Cellijnen

De 5D10 hybridoma-celijn werd bekomen door het fusioneren van miltcellen van met MCF-7 geïmmunizeerde muizen met SP2/0 cellen (Plessers e.a., 1990). De celijn produceert het 5D10 monoclonaal muis antilichaam dat behoort tot de IgG3 subklasse. Dit antilichaam herkent MCF-7 humane borstkankercellen en bindt eveneens doch in mindere mate aan epitheliale cellen. Uit de 5D10 hybridomacellen werden de 5D10 immunoglobuline genen geïsoleerd en gebruikt voor chimerisatie. Het 5D10 muis antilichaam werd als vergelijkend materiaal gebruikt in bindingstesten.

SP2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581) is een niet Ig-producerende muis hybridoma cellijn die afgeleid is van de myeloma cellijn MOPC21 (Shulmann e.a., 1978). Deze cellijn is niet in staat antilichamen te produceren maar bevat nog wel de nodige elementen en herkenningsfuncties voor de secretie en produktie van immunoglobulinen. Deze cellijn werd reeds door menig onderzoeker gebruikt voor de introductie en expressie van immunoglobuline genen. De cellijn werd door ons gebruikt voor achteréenvolgende transfectie van chimere lichte en zware keten genen.

LICR /LON/HMy2 is een humane antilichaam producerende cellijn die afgeleid is van een leukemia cellijn (Edwards e.a., 1982). Deze cellijn produceert een humaan antilichaam van subklasse IgG1/ kappa die als positieve controle gebruikt werd voor verscheidene testen.

De Daudi cellijn (ATCC CCL 213) is een goed gekarakteriseerde humane B lymfoblast cellijn die werd gebruikt als targetcellen in bindingstesten voor het karakteriseren van het chimeer antilichaam (negatieve controle).

MCF-7 (ATCC HTB 22) is een goed beschreven subtetraploïde humane borsttumorceldijn. De cellijn werd bekomen na het injecteren van epitheliale borsttumorcellen in een naakte muis (NM376), waarvan het ascites vocht in cultuur werd gebracht (Soule e.a., 1973). Deze cellen werden gebruikt voor alle bindingsstudies met het 5D10 muis en chimeer antilichaam.

2.12. Celkweek

Voor het uitvoeren van de celkweek experimenten baseerden we ons op de technieken beschreven in de handleiding van Campbell (1987). De meeste cellijnen werden gekweekt in RPMI 1640 medium (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS) voorzien van 10% "Fetal Calf Serum" (FCS), 1% niet-essentiële aminozuren, 2 mM L-glutamine, 1 mM natrium pyruvaat (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS) en 1 % hepes buffer (FlowICN, High Wycombe, UK). Het FCS werd op voorhand geïnactiveerd bij 56°C

gedurende 30 minuten. De cellen werden opgegroeid in 80 cm² weefselkweekflessen (NUNC, Roskilde, Denemarken) met 20 tot 40 ml kweekmedium en geïncubeerd in een CO₂-broedstoof (Vel, Leuven, B) bij 37°C en 5% CO₂.

De MCF-7 borstkankercellen werden gekweekt als monolayers in 80 cm² kweekflessen. Het kweekmedium werd bereid uitgaande van "Minimal Essential Medium (MEM)" (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS) aangevuld met dezelfde componenten als voor het RPMI 1640 medium. De cellen werden regelmatig lichtmicroscopisch geobserveerd en 3 maal per week uitgesplitst. Het uitsplitsen van de meeste cellijnen gebeurde door een fractie van de celsuspensie over te brengen in een nieuwe kweekfles en deze aan te vullen met vers medium. De MCF-7 cellen werden voor het uitsplitsen losgemaakt uit hun monolayer met een 0,5 % trypsine / 0,2 % EDTA-mengsel (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS). Het medium werd eerst afgegoten en enkele ml trypsine/ EDTA-oplossing werden toegevoegd aan de cellen. Na een incubatie gedurende enkele minuten bij kamertemperatuur werd de oplossing afgegoten en werd de kweekfles in de CO₂-broedstoof geplaatst gedurende 2-5 minuten. Na het loskloppen van de cellen werden ze in suspensie gebracht in vers medium en verdeeld over nieuwe kweekflessen. Het tellen van de cellen gebeurde met een Fuchs-Rosenthal telkamer.

Een deel van de cellen werd bewaard in kweekmedium met 10 % DMSO en 40% FCS. Ze werden uitverdeeld in 1,8 ml vriesampullen (NUNC, Roskilde, Denemarken), bewaard bij -70°C gedurende 1 nacht en ingevroren in vloeibare stikstof (-196°C). Voor het terug in kweek brengen van de cellen, werd de ampul ontdooid bij 37°C en de celsuspensie werd verdund in 10 ml kweekmedium. Na centrifugatie werd de celpellet in suspensie gebracht in 10 ml kweekmedium en in een 25 cm² kweekfles opgegroeid.

Voor het uitvoeren van eindpuntdiluties (Limiting Dilution) werden 1 tot 3 cellen aangebracht in één kuiltje van een microtiter plaat samen met peritoneale macrofagen als feederlayercellen (aan 1500 tot 3000 cellen per kuiltje) of in medium aangevuld met 10 % kloneringssupplement (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS). Na 3 dagen incubatie in een CO₂-broedstoof werd 100 µl selectiemedium (2.13.) toegevoegd aan ieder kuiltje. Na 2 tot 4 weken incubatie werden verschillende populaties gescreend voor proliferatie m.b.v. ELISA (zie 2.14).

2.13. Elektroporatie

Voor het transfacteren van gekloneerde genen in dierlijke cellen werd de elektroporatie-methode gevolgd van Potter e.a.(1984). Hierbij wordt het DNA getransfecteerd in murine cellen onder invloed van een elektrische schok van hoog voltage. Voor de transfectie werd gebruik gemaakt van een elektroporatie-toestel (Biorad Laboratories, CA, VS).

10^6 SP2/0 cellen werden gewassen met PBS en na centrifugatie gesuspenderd in 800 μ l koude PBS en in een elektroporatie- cuvette (Biorad Laboratories, CA, VS) op ijs geplaatst. Het te transfacteren DNA werd op voorhand bereid en opgezuiverd zoals beschreven in 2.9.3.. Voor sommige transfecties werd het DNA met enzymen (*Bam*HI of *Pvu*I) gelineariseerd omdat dit de transfectie-frequentie zou verhogen (Johnson en Phelps, 1988). Na linearisatie werd het DNA gescheiden op een LMP-agarose gel (2.7.), geëluëerd uit het gel en opgezuiverd m.b.v. de "Prep-A-gene" DNA-opzuiverings kit (Biorad Laboratories, Richmond, MD, VS). 1 tot 5 μ g van het opgezuiverde DNA werd toegevoegd aan de SP2/0 cellen in de elektroporatie-cuvette en het mengsel werd 10 minuten op ijs geïncubeerd. Vervolgens werd de cuvette onderworpen aan één elektrische schok waarbij wij het Voltage lieten variëren van 150 V tot 200 V bij een capacitantie van 960 μ F. De halfwaardetijd lag steeds tussen 15 tot 35 msec.. Na een tweede incubatie op ijs van 10 minuten, werd de oplossing gedurende 10 minuten bij 1200 rpm gecentrifugeerd. Vervolgens werden de cellen gesuspenderd in kweekmedium en uitverdeeld aan 10.000 cellen/ 2 ml kuiltje van een cultuurplaat met 24 kuiltjes (Nunc, Roskilde, Denemarken). Na een incubatie van 2 tot 3 dagen bij 37°C in de CO₂-broedstoof werd 1 ml medium verwijderd en vervangen door 1 ml selectiemedium. Voor de PSV-*gpt* vectoren bestond dit selectiemedium uit RPMI 1640 medium aangevuld met de componenten beschreven in 2.12. aangerijkt met 5 % geïnactiveerd FCS, xanthine (250 μ g/ml) (Sigma, St.-Louis, MO), hypoxanthine (15 μ g/ml) (Sigma, St.-Louis, MO) en mycofenolzuur (1 μ g/ml) (GibcoBLR, Gaithersburg, MD, VS). Voor PSV-vectoren met het *hyg*-gen gebeurde de selectie van de getransfekteerde cellen met medium aangevuld met hygromycine B (400 μ g/ml) (Sigma, St.-Louis, MO). Na een zevental dagen verschenen de eerste klonen die een resistentie vertoonden. De cellen werden verder geïncubeerd tot de klonen uitgegroeid waren,

vervolgens werd het supernatans verwijderd en getest op antilichaam-productie m.b.v. ELISA. De producerende cellijnen werden gekloneerd d.m.v. eindpunt-dilutie (2.12.).

2.14. "Enzyme Linked Immunosorbent assay" (ELISA)

2.14.1. Detectie van de chimere lichte keten

Een microtiterplaat met 96 kuiltes (Nunc, Roskilde, Denemarken) werd gevuld met een 1/1000 verdunning van konijn anti-humaan kappa antiserum (Dakopatts, Copenhagen, Denemarken) in een carbonaatbuffer pH 9,5 (15 mM Na_2CO_3 ; 34 mM NaHCO_3 ; 0,1 % NaN_3) aan 100 μl /kuiltje en 1 nacht geïncubeerd bij 4°C ("coating"). Vervolgens werd de plaat leeggieten en 3 maal gewassen met wasbuffer (PBS met 0,01 % Tween-80). Daarna werd ieder kuiltje gevuld met 100 μl van 2% FCS verdund in PBS en werd de plaat 1 uur geïncubeerd bij 37°C, deze "overcoating" diende om de niet bezette plaatsen op te vullen. Na het leeggieten en het wassen van de microtiterplaat met wasbuffer, werd elk kuiltje gevuld met 100 μl van het supernatans van de getransfecteerde cellen. De microtiterplaat werd gedurende 2 uur geïncubeerd bij 37°C en na het leeggieten, 3 maal gewassen met wasbuffer. Vervolgens werd aan ieder kuiltje 100 μl geit anti-humaan kappa peroxidase conjugaat (1/1000 verdund in PBS) (Sigma, St.-Louis, MO) toegevoegd en werd de plaat 2 uur geïncubeerd bij 37°C. Na het wassen, werd de enzymatische kleurreactie doorgevoerd door ieder kuiltje te vullen met 100 μl van een oplossing bestaande uit 0,1 % OPD (Merck, Darmstadt, D), 0,1 % H_2O_2 in citraatbuffer pH 5 (19 mM citroenzuur, 50 mM dinatriumwaterstoffsfaat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). De kleurreactie werd na 2 tot 10 minuten gestopt door toevoegen van 50 μl 4 M H_2SO_4 . De absorbantie werd gemeten bij 492 nm met een Titertek toestel (FlowICN, High Wycombe, UK).

2.14.2. Detectie van de chimere zware keten

Het detecteren van de chimere zware keten werd op dezelfde manier uitgevoerd als het detecteren van de lichte keten. Hierbij werd ieder kuiltje van de microtiter plaat gevuld met 100 μl geit anti-humaan IgG (Fab) antilichaam (1/1000 verdund in PBS)

(Sigma, St.-Louis, MO) ("coating"). Na "overcoating" en het wassen werd het supernatans van de transfectoma's aangebracht. Na een eerste incubatie gedurende 2 uur bij 37°C werd het antilichaam gedetecteerd met 100 µl geit anti-humaan biotine conjugaat (1/1000 verdund in PBS) (Amersham, Buckinghamshire, UK). Na het wassen volgde een tweede incubatie van 1 uur met 100 µl streptavidine peroxidase conjugaat (1/1000 verdund in PBS) (Amersham, Buckinghamshire, UK). De enzymatische kleurreactie gebeurde op dezelfde manier als beschreven in 2.14.1.

Voor beide detectie-methoden werd het supernatans van de LICR/LON/HMy2 cellijn als positieve controle (2.11.) en het supernatans van de SP2/0-Ag14 cellijn als negatieve controle (2.11.) gebruikt.

2.14.3. Bindingsdetectie van het chimeer antilichaam aan MCF-7 borstkankercellen

De binding van het 5D10 chimeer antilichaam aan de MCF-7 borstkankercellen werd nagegaan m.b.v. ELISA. Hierbij werden de MCF-7 cellen na trypsinisatie (2.12.) opgelost in MEM kweekmedium aan 5×10^5 cellen/ml en uitverdeeld in microtiterplaten (50 µl/kuiltje) (Becton Dickinson, CA, VS). De platen werden één nacht geïncubeerd in de CO₂-broedstof bij 37°C zodat de cellen zich konden vastzetten op de bodem. Na de incubatie werd het medium verwijderd en werd de plaat 3 x gewassen met PBS. Vervolgens fixeerden we de cellen met 0,4 % glutaraaldehyde (100 µl/kuiltje) (Sigma, St.-Louis, MO). Na een incubatie van 10 minuten bij kamertemperatuur, werd de plaat leeggegoten en opnieuw gewassen. Daarna werd een 0,1 M glycine oplossing toegevoegd (100 µl /kuiltje) en volgde een incubatie van 15 minuten bij kamertemperatuur. Na het verwijderen van deze oplossing werd de plaat weer gewassen en voor bewaring bij 4°C nabehandeld met een 1% BSA/ 0,1% Na-azide oplossing (100 µl /kuiltje). Alle verdunningen en oplossingen werden aangemaakt in PBS.

Voor het uitvoeren van de ELISA werden de gefixeerde cellen gewassen met PBS en werd de plaat "overcoat" met 2 % FCS. Na 1 uur incubatie bij 37°C werd de plaat leeggegoten en gewassen met 0,01% Tween-80 in PBS. Vervolgens werden de

stalen (opgezuiverd of niet) aangebracht onder de vorm van een verdunningsreeks en incubeerden we de plaat gedurende 2 uur bij 37°C. Daarna werd het niet-gebonden materiaal weggewassen. De binding van het chimeer antilichaam aan de MCF-7 borstkankercellen werd gedetecteerd met geit anti-humaan biotine conjugaat (Amersham, Buckinghamshire, UK) en streptavidine-peroxidase conjugaat (Amersham, Buckinghamshire, UK) zoals beschreven in 2.14.2..

Het 5D10 muis antilichaam werd als positieve controle gebruikt en een irrelevant muis IgG3 antilichaam (Sigma, St.-Louis, MO) als negatieve controle. Beide werden gedetecteerd met het affiniteits-gezuiverd geit anti-muis peroxidase conjugaat (Dakopatts, Kopenhagen, Denemarken). Andere negatieve controles waren een irrelevant humaan IgG1/kappa antilichaam (Sigma, St.-Louis, MO) en het supernatans van de LICR/LON/HMy2 cellijn die op dezelfde manier gedetecteerd werden als het chimeer antilichaam.

2.15. Eiwit-elektroforese

De scheiding van eiwitten op basis van moleculair gewicht werd uitgevoerd met polyacrylamide gelen onder denaturerende omstandigheden via elektroforese (Laemmli, 1970). Na het opkoken van de eiwitten in de aanwezigheid van SDS en 2-mercapto-ethanol werden ze gescheiden op het gel. Een 10 % scheidingsgel bestond uit 10 % acrylamide, 0,33 % N,N'-methyleenbisacrylamide, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8) en 0,1 % SDS. Na het stollen van het gel door polymerisatie van acrylamide en N,N'-methyleenbisacrylamide in de aanwezigheid van 0,05% ammoniumpersulfaat (APS) en 0,065 % TEMED, werd op het scheidingsgel een 5% concentratiegel (5 % acrylamide; 0,16 % bisacrylamide; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,034 % APS; 0,1 % TEMED) gegoten. Als loopbuffer voor de denaturerende gelen werd een 25 mM Tris-HCl/ 192 mM glycine buffer met 1 % SDS en pH 8,3 gebruikt. De eiwitstalen werden aangelengd met éénzelfde volume staalbuffer (62 mM Tris-HCl, 10 % glycerol, 5 % 2-mercapto-ethanol, 2 % SDS, 0,01 % broomfenolblauw) en 5 minuten opgekookt bij 95°C. Na centrifugatie bij 13 000 rpm gedurende 3 minuten werden de stalen op het polyacrylamidegel aangebracht en werd de elektroforese uitgevoerd. Hiervoor werd het

vertikaal elektroforese-systeem van Hoefer Scientific Instruments (SF, Californië) gebruikt waarbij de elektroforese werd uitgevoerd bij 60 mA.

Het eiwitgel werd na elektroforese gekleurd met een Coomassie blauw-oplossing (0,1 % Coomassie-blauw, 10 % azijnzuur, 25 % methanol) gedurende 2 tot 16 uur of gebruikt voor elektroblotting (2.16.). Vervolgens werd het gel ontkleurd met 10 % azijnzuur/ 25 % methanol en gedroogd op "Whatmann" filter papier (Vel, Leuven, B) in de vacuum droger (Biorad Laboratories, Richmond, MD, VS) gedurende 30 minuten. Als controle voor de blotting en als moleculaire gewichtsmarker werd een kalibratie kit (PharmaciaLKB, Uppsala, Sweden) gebruikt.

Om het moleculair gewicht van de antilichamen te bepalen m.b.v. eiwit-elektroforese, was het noodzakelijk op voorhand de cellen die het antilichaam produceren, in proteïne vrij medium (GibcoBRL, Gaithersburg, VS) te kweken of het antilichaam te zuiveren omdat het FCS teveel achtergrondsignaal gaf.

2.16 Immunoblot

Na de scheiding van de eiwitten op het polyacrylamide gel, werden ze getransferreerd naar een nitrocellulose membraan (PharmaciaLKB, Uppsala, Sweden) door elektro-"blotting". Hiervoor gebruikten we een "blot" toestel (PharmaciaLKB, Uppsala, Sweden) waarvan we de grafietplaten reinigden met gedestilleerd water. Op de positieve elektrode (anode) werden 6 lagen "Whatmann" filterpapier geplaatst gedrenkt in anodebuffer 1 (0,3 M Tris-HCl, 20 % methanol, pH 10,4), gevolgd door 3 lagen "Whatmann" filterpapier gedrenkt in anodebuffer 2 (25 mM Tris, 20 % methanol, pH 10,4). Hierop werd het 0,2 µM nitrocellulose membraan (PharmaciaLKB, Uppsala, Sweden) gelegd gevolgd door het polyacrylamide-gel. Beiden werden eerst in anodebuffer 2 gedompeld. Vervolgens werden 3 lagen "Whatmann" filterpapier op het gel geplaatst, gedrenkt in anodebuffer 2, gevolgd door 6 lagen "Whatmann" filterpapier gedrenkt in kathodebuffer (20 % methanol) en tenslotte werd hierop de negatieve elektrode (kathode) geplaatst. Het elektroblot apparaat werd afgesloten en de stroom werd ingesteld aan 0,8 mA/cm² gedurende 90 minuten.

Daarna werd het membraan gekleurd met Ponceau S (Sigma, St.-Louis, MO) en nagespoeld met gedestilleerd water. De eiwitten werden tijdelijk zichtbaar zodat we de ladingsplaatsen van de stalen en het moleculair merker eiwit konden aanduiden. Het stukje filter met het moleculair merker eiwit werd verwijderd en gekleurd met "Amido black" oplossing (0,1 % Amido black, 10% azijnzuur, 25 % methanol). De kleurreactie werd gestopt door het stukje filter te wassen met 10% azijnzuur/ 25% methanol. De rest van het membraan werd gebruikt voor immunologische kleuring. Eerst werden de onbezette plaatsen op de filter opgevuld door het membraan gedurende 16 tot 18 uur in "blocking"-reagens (250 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, 0,2 % Tween-80) bij 4°C te incuberen. Na het wassen van de filter met een incubatieoplossing (250 mM Tris, 750 mM NaCl, 0,05 % Tween-80) gedurende 5 minuten, werd het membraan bij kamertemperatuur al schuddend geïncubeerd in een verdunde conjugaat oplossing :

1. Voor het detecteren van de lichte keten, werd het membraan gedurende 2 uur geïncubeerd met geit anti-humaan peroxidase conjugaat, 1/1500 verdund in incubatie-oplossing (Sigma, St.-Louis, MO).
2. Voor het detecteren van de zware keten werd het membraan geïncubeerd met geit anti-humaan biotine conjugaat (1/1500 verdund in incubatieoplossing) (Amersham, Buckinghamshire, UK) gedurende 2 uur gevolgd door een incubatie van 1 uur met streptavidine-peroxidase conjugaat (1/1500 verdund in incubatie-oplossing) (Amersham, Buckinghamshire, UK). Tussenin werd het membraan 3 x maal gewassen met incubatie-oplossing telkens gedurende 10 minuten.
3. Voor de detectie van beide ketens, werd het membraan 2 uur geïncubeerd met geit anti-humaan biotine conjugaat (Amersham, Buckinghamshire, UK) gevolgd door 90 minuten incubatie met het geit anti-humaan kappa peroxidase conjugaat (Sigma, St.-Louis, MO) samengevoegd met het streptavidine-peroxidase conjugaat (Amersham, Buckinghamshire, UK) (beide conjugaten aan 1/1500 verdunning in incubatie-oplossing). Tussen beide incubaties in werd het membraan goed gewassen.

De kleurreactie werd uitgevoerd door het membraan te incuberen met 0,04 % tetramethylbenzidine (5% TMB in aceton) en 0,04 % H_2O_2 in "TMB"-oplossing. De "TMB"-oplossing werd op voorhand gemaakt en bestond uit 80 % Natriumacetaat buffer (85 mM) en 20 % DSS buffer (9 mM DSS, 50 % ethanol). Na 10 minuten werd de

reactie onderbroken door het membraan in 20 % DSS buffer te dompelen gedurende 30 minuten. De immunoblotting werd gecontroleerd door het gel, na "Western" blotting te kleuren met Coomassieblauwkleuring.

2.17. De FACS-analyse

De FACS-analyse werd gebruikt voor het analyseren van de binding van het chimeer antilichaam aan de MCF-7 borstkankercellen m.b.v. fluorescerende antilichamen. Na het merken van de cellen, werden ze geanalyseerd met FACS. Hierbij werden de cellen langs een laserstraal gestuurd waarbij de fluorescentie-intensiteit van ieder cel afzonderlijk werd gemeten. De verdeling van de fluorescentie-intensiteit t.o.v. de celpopulatie werd uitgezet in een FACS-diagramma.

2.17.1. De "phycoerythrine" (PE) kleuring

De MCF-7 cellen werden na trypsinisatie (2.12.) gewassen met FACS-buffer (PBS met 5% FCS). Per analyse werden 10^5 cellen in 50 μ l FACS-buffer gesuspenderd en in een 1,8 ml eppendorf buisje gebracht. 100 μ l supernatans van de transfectoma's, monoklonalen of opgezuiverde antilichamen werden aan het buisje toegevoegd. Na een incubatie van 30 minuten op ijs werden de buisjes gecentrifugeerd en werd de celpellet gewassen met 1 ml FACS-buffer. Na een tweede centrifugatie werd de celpellet opgelost in 50 μ l FACS-buffer.

Voor het detecteren van chimere of humane antilichamen werd 50 μ l geit anti-humaan biotine conjugaat (1/100 verdund in FACS-buffer) (Amersham, Buckinghamshire, UK) aan de celsuspensie toegevoegd en werd de oplossing 30 minuten geïncubeerd op ijs. Na het wassen van de cellen volgde een tweede incubatie met 20 μ l Streptavidin-PE (Becton Dickinson, CA, VS) gedurende 30 minuten op ijs. Vervolgens werden de buisjes gecentrifugeerd (10 seconden aan 13 000 rpm) en na het wassen van de cellen werden ze gesuspenderd in 500 μ l FACS-buffer waarna ze onmiddellijk voor een analyse met FACScan (Becton Dickinson, CA, VS) werden gebruikt.

De binding van de muis antilichamen aan de kankercellen werd gedetecteerd met 50 μ l (1/100 verdund in FACS-buffer) anti-muis kappa PE-conjugaat (Becton

Dickinson, CA, VS). Na een incubatie gedurende 30 minuten op ijs, werden de cellen weer gewassen, gesuspenderd in 500 µl FACS-buffer en onmiddellijk gebruikt voor analyse met FACScan.

2.17.2. De "fluoresceïne isothiocyanaat" (FITC) kleuring

Een tweede mogelijkheid is het detecteren van de binding met "fluoresceïne isothiocyanaat" (FITC) gemerkte conjugaten. De uitvoering gebeurde op dezelfde manier als beschreven in 2.17.1. Waarbij het detecteren van chimere of humane antilichamen gebeurde met 10 µl anti-humaan FITC-conjugaat (Boehringer, Mannheim, D). De detectie van muis antilichamen gebeurde met 10 µl anti-muis FITC-conjugaat (Becton Dickinson, CA, VS).

2.18. Proteïne A-sepharose chromatografie

De chimere antilichamen werden gezuiverd via affiniteits-chromatografie (Ey e.a., 1978) op een Proteïne-A Sepharose CL-4B kolom (PharmaciaLKB, Uppsala, S). De transfectoma's werden in grote aantallen gekweekt in proteïne vrij medium (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS). Vervolgens werd het celkweeksupernatans verwijderd en gedialyseerd t.o.v. fysiologisch water (0,9% NaCl pH 7-8) gedurende 24 uur bij 4°C en onder regelmatige verversing van het fysiologisch water. Na dialyse werd het supernatans geconcentreerd tot een volume van 50 ml met een "hollow fiber concentration" systeem (Amicon, Danvers Massachusetts, USA). Het concentraat werd door een 0,2 µm filter (Sortirus, Göttingen, D) gefiltreerd en aangelengd met één volume steriele bindingsbuffer pH 9 (3 M NaCl, 1,45 M glycine). Na het spoelen van de proteïne A-sepharose kolom met bindingsbuffer, werd het staal op de kolom aangebracht (pompsnelheid 0,58 ml/min), de niet-gebonden eiwitten werden weggewassen met bindingsbuffer. Vervolgens werd de gebonden fractie van de kolom geëluëerd met pH 3 elutiebuffer (20 mM NaCl, 40 mM citroenzuur) en opgevangen in buisjes van de fractie-collector (PharmaciaLKB, Uppsala, S) die gevuld waren met 200 µl Tris-HCl (1 M, pH 9). De absorbantie van de fracties werd gemeten bij 280 nm t.o.v. een blanco waarde (200 µl Tris-HCl, 3 ml elutiebuffer). De fracties die het eiwit bevatten werden

samen gevoegd en gedialyseerd t.o.v. PBS (pH 7-8). Na dialyse werd de eiwitoplossing geconcentreerd met "centriprep 30" (Amicon, Beverly, MA, USA), uitverdeeld in eppendorfbuisjes en bewaard bij -20°C. De proteïne A-Sepharose kolom werd na dialyse geregenereerd met 48 % methanol en op bewaarbuffer (0,02 % thiomersal in PBS) gezet.

2.19. "Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" (ADCC) test

De biologische activiteit van een antilichaam kan worden getest in een "chromium release" standaard test van 4 uur. Bij het uitvoeren van een dergelijke test werden 2×10^6 target cellen (MCF-7 of Daudi cellen) gesuspenderd in 200 µl RPMI 1640 medium en gemerkt met 200 µCi ^{51}Cr (Na₂Cr₂O₇, Amersham, Arlington Heights, IL) gedurende 1 uur bij 37°C. Vervolgens werden de target cellen 5 x gewassen met RPMI 1640 medium en na iedere wasstap gecentrifugeerd (5 minuten bij 1000 rpm). Na het radioactief merken van de target cellen werden ze uitverdeeld aan 5×10^3 cellen/100 µl in een microtiterplaat (Nunc, Roskilde, Denemarken). Vervolgens werden mononucleaire effectorcellen (PBLs) uit het menselijk bloed geïsoleerd via gradiënt dichtheid centrifugatie met Ficoll (FlowICN, High Wycombe, UK). Het bloed werd aangelengd met één volume PBS en voorzichtig op Ficoll gebracht (2 volume bloed per volume Ficoll) in een 15 ml buis. Na centrifugatie gedurende 20 minuten bij 2000 rpm werden de mononucleaire cellen uit de interfase verwijderd en 5 x gewassen met RPMI 1640 medium. Na elke wasstap werden de cellen 10 minuten gecentrifugeerd bij 1500 rpm en terug in suspensie gebracht in vers medium. De effectorcellen (PBLs) werden verdeeld over de microtiterplaat aan 50 µl/kuiltje in een effector/target (E:T) verhouding van 10:1, 50:1 en 100:1. Het antilichaam (het 5D10 monoclonaal, het 1D8 chimeer of een irrelevant humaan IgG antilichaam (Sigma, St.-Louis, MO)) werd toegevoegd aan 50 µl/kuiltje. De concentratie van het antilichaam varieerde van 5 µg tot 25 µg/ml.

De effectorcellen (PBLs) werden met radioactief gemerkte target cellen (MCF-7 of Daudi cellen) in duplicaat geïncubeerd voor 4 uur bij 37°C in de CO₂-broedstoof. De radioactiviteit van het supernatans werd geanalyseerd d.m.v. een gamma-teller (Packard Instrument Company, Illinois, VS).

De totale vrijzetting van de radioactiviteit werd bepaald door target cellen (MCF-7 of Daudi cellen) te lyseren met 100 μ l H_2SO_4 (4M). De spontane ^{51}Cr vrijzetting werd bepaald door target cellen (MCF-7 of Daudi cellen) te incuberen met medium.

HOOFDSTUK 3 : ISOLATIE EN KARAKTERISATIE VAN DE VARIABELE GEBIEDEN VAN HET 5D10 MUIZENANTILICHAAM

3.1. Inleiding

Voor de aanmaak van chimere antilichaam-genen werden meestal genomische variabele genen of zware en lichte keten cDNA-fragmenten genomen (Morrison e.a., 1984; Liu e.a., 1987; Brüggemann e.a., 1989). Het maken van een genomische bank of een cDNA bank en screening is echter omslachtig en tijdrovend werk. Tegenwoordig kan men met behulp van de PCR-techniek (Saiki e.a., 1987) immunoglobuline-genen isoleren en kloneren. Winter en medewerkers ontdekten geconserveerde regio's aan elk uiteinde van de nucleotide-sequenties die coderen voor de variabele gebieden van deze genen. Zij ontwierpen PCR-primer oligonucleotiden die voorzien zijn van knipplaatsen voor restrictie-enzymen waardoor een gemakkelijke klonering van immunoglobuline-genen mogelijk wordt (Orlandi e.a., 1989).

Bij het maken van de chimere antilichamen kan de aanéenschakeling van genen op verschillende manieren gebeuren. In de eerste methode gaat men muis V-gebieden koppelen aan humane C-gebieden d.m.v. een willekeurige restrictieplaats in het intron tussen beide coderende plaatsen (Boulianne e.a. 1984, Morrison e.a. 1984, Brüggemann e.a. 1989, Orlandi e.a. 1989, Xiang e.a. 1990). In de tweede methode koppelt men de genen aan elkaar zonder een intron nml. door een restrictieplaats te creëren vooraan in het cDNA van het muis C-gebied en op de overeenkomstige plaats in het humane C-gebied (Liu e.a. 1987, Hoogenboom e.a. 1990). Er werd echter aangetoond dat men een verhoogde expressie van het chimeer antilichaam krijgt wanneer het V- en C-gebied met elkaar verbonden werden door een intron (Dr. W.J. Harris, University of Aberdeen, persoonlijke mededeling). Wij opteerden dan ook voor de eerste methode om het 5D10 chimeer antilichaam te construeren.

Voor het construeren van chimere antilichamen is het noodzakelijk de genen die coderen voor de variabele gebieden van het muis antilichaam te isoleren uit de 5D10

producerende hybridomacellijn. In eerste instantie werd daarom het RNA uit de cellen geïsoleerd en omgezet tot eerste streng cDNA (Levy e.a., 1987). De initiatie van de eerste streng cDNA-synthese gebeurde met Ig-specifieke primer oligonucleotiden en werd opgevolgd door een PCR-reaktie. De primer oligonucleotiden die gebruikt werden in beide reakties werden speciaal ontwikkeld voor de isolatie van genen die coderen voor de variabele gebieden van muis immunoglobulinen (Orlandi e.a.; 1989, Jones, S.T. en M.M. Bendig, 1991). Deze primer oligonucleotiden werden voorzien van knipplaatsen zodat de geamplificeerde fragmenten na restrictie rechtstreeks gekloneerd werden in vectoren. De vectoren die we hiervoor gebruiken, werden ons toegestuurd door Prof. G. Winter (MRC, Cambridge, UK). Deze M13-vectoren bevatten een expressiecassette bestaande uit de promotor en signaalpeptide sequentie van de zware keten en kloneringsplaatsen voor de geamplificeerde genen.

Na het amplificeren en kloneren van de genen, werden ze aan de hand van sequentie-analysen gekarakteriseerd en ondergebracht in immunoglobuline-klassen volgens Kabat e.a. (1987). De gekloneerde genen met de expressiecassette werden uit de M13-vectoren verwijderd en overgebracht naar PSV-vectoren die de sequenties van de humane constante gebieden bevatten. Op deze wijze werden de variabele gebieden met een intron aan de constante gebieden gekoppeld.

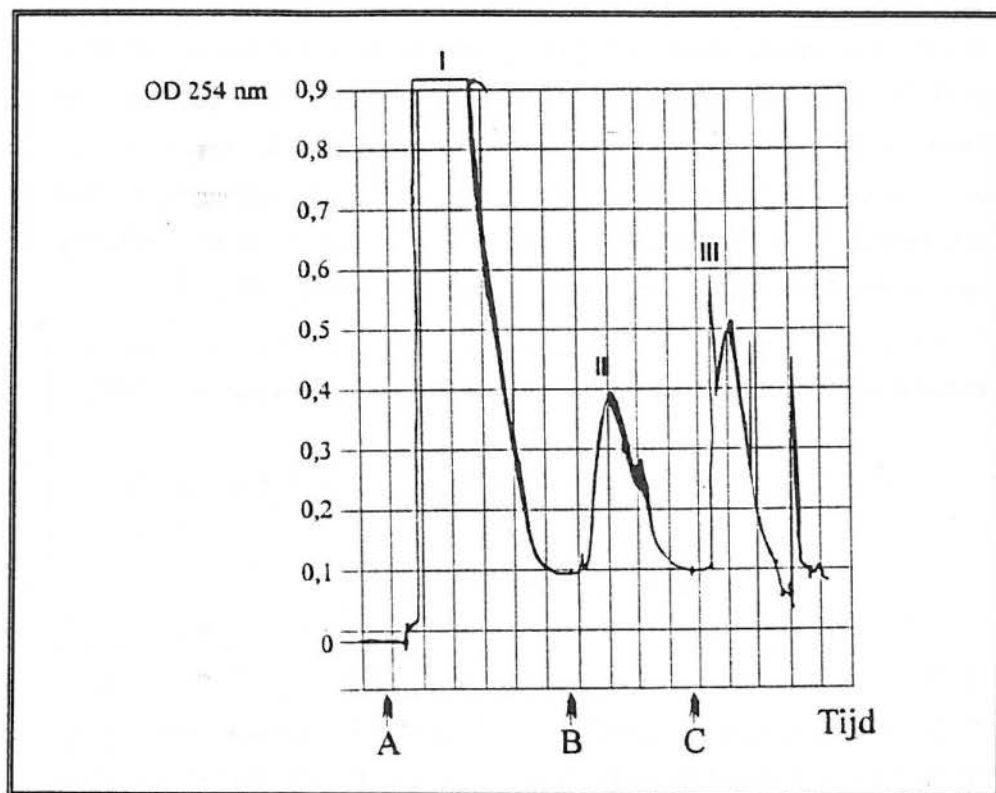
3.2. Isolatie van het RNA en bereiding van het mRNA

Aanvankelijk werd het RNA uit de 5D10 hybridomacellen (Plessers e.a., 1990) geëxtraheerd m.b.v. de methode beschreven door Opdenakker e.a. (1982) (zie 2.1.). Na het neerslaan van het RNA m.b.v. de ultracentrifugatie (30 minuten bij 4°C aan 30 000 rpm) werd het mRNA aangerijkt m.b.v. affiniteitschromatografie volgens Aviv en Leder (1972). Figuur 3.1. stelt het elutiepatroon voor van een dergelijke scheiding. Na het wassen van de oligo (dT)-cellulose kolom (PharmaciaLKB, Uppsala, S) met 0,1 M NaOH, volgde een equilibratie met startbuffer (0,01 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,5 M NaCl en 0,1% SDS). Het RNA, verdund in startbuffer, werd over de kolom gehaald (A). Na het wassen (B) werd het gebonden poly(A)⁺-RNA van de kolom geëluëerd met elutiebuffer (0,01 M Tris/ HCl, pH 7,5; 0,1 M NaCl en 0,1 % SDS) (C). Na het precipiteren van het

poly(A)⁺-RNA met ethanol/ 0,1 M NaCl, werd de concentratie bepaald. Het percentage poly(A)⁺-RNA bedroeg 1,2 % van het totale RNA.

Figuur 3.1. : Elutiepatroon van een affiniteitschromatografie van RNA geëxtraheerd uit de 5D10 producerende hybridomacellijn.

De pieken stellen achteréenvolgens voor : niet gebonden totaal RNA (I), gewegwassen RNA (II), geëluëerd mRNA (III). De X-as stelt de tijdstippen van gebruikte buffers voor met A = de startbuffer met het RNA-staal, B = wasbuffer, C = elutiebuffer.



Het poly(A)⁺-RNA werd gebruikt voor de synthese van specifiek cDNA en de daaropvolgende PCR-reakties. De hoeveelheid en intactheid van het mRNA bleek niet voldoende voor de isolatie van de V-genen. Vervolgens werd totaal RNA geëxtraheerd uit de 5D10 producerende hybridomacellijn maar op een eenvoudigere manier namelijk m.b.v. de RNazol B methode (zie 2.1.). De zuiverheid van het RNA werd gecontroleerd

op een 0,7 % agarose gel. De opbrengst bedroeg 5 µg RNA vertrekkende van 5×10^6 cellen.

3.3. Bereiding van het Ig-specifiek cDNA

Na de isolatie van het totaal RNA, werd gebruik gemaakt van Ig-specifieke oligonucleotiden als initiator voor de eerste streng cDNA-synthese. Deze methode maakt het mogelijk Ig-specifiek cDNA aan te maken (Levy e.a., 1987) en is minder omslachtig dan het aanleggen van genomische of cDNA-banken. De gebruikte primer oligonucleotiden werden ontwikkeld door Winter en zijn medewerkers (Medical Research Council, Cambridge, UK). Deze onderzoekers toonden aan dat de nucleotide sequentie van zowel de 5'- als de 3'-uiteinden van de V-gebieden van de muis immunoglobulinen sterk geconserveerd zijn. Door middel van computerprogramma's werden primers ontworpen waardoor men de V_H en V_K gebieden van een willekeurig murine antistof kan isoleren m.b.v. de PCR-techniek (Orlandi e.a. 1989).

De initiator voor muis V_H (VH1FOR) en V_K (VK1FOR) volgens Orlandi e.a. (1989) :

VH1FOR : 5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC-3'

BstEII

VK1FOR : 5'-GTTAGATCTCCAGCTTGGTCCC-3'

BglII

Beide primer oligonucleotiden VH1FOR en VK1FOR zijn complementair aan het mRNA in het immunoglobuline J-gebied van de zware en de lichte keten. De primers werden voorzien van enzymatische knipplaatsen aan het minst geconserveerde deel van de primer nml. aan het 5'-uiteinde. De VH1FOR primer bevat een *BstEII* knipplaats en de VK1FOR primer is voorzien van een *BglII* knipplaats.

Uitgaande van 5 µg poly(A)⁺-RNA of 10 µg totaal RNA van de 5D10 hybridomacellen werd het eerste streng cDNA bereid met een immunoglobuline

specifieke primer (Levy e.a., 1987). Voor de isolatie van het variabel gebied van de zware keten V_H werd 50 pmol van de VH1FOR primer gebruikt en werd de reactie uitgevoerd zoals beschreven in 2.2.. Voor de isolatie van het variabel gebied van de lichte keten werd 50 pmol van de VK1FOR primer gebruikt (Orlandi e.a., 1989). Na de synthese werd het cDNA geprecipiteerd en opgelost in 100 μ l steriel water. De zuiverheid van het cDNA werd gecontroleerd door een fractie van het reaktiemengsel te scheiden op een 1 % agarose gel. Het cDNA werd gevisualiseerd op een UV transilluminator in de aanwezigheid van ethidiumbromide. Het zuivere cDNA verscheen als 2 banden, dit specifiek cDNA kon gebruikt worden als "template" voor de amplificatie van de variabele genen in de PCR-reactie. De specificiteit van het cDNA werd bepaald na de PCR-reakties aan de hand van sequentie-analyse.

3.4. Amplificatie van het zware keten variabel gebied

Na de eerste streng cDNA-synthese met de VH1FOR primer als initiator voor de reactie, werd het V_H -gebied geamplificeerd m.b.v. de PCR-techniek. Voor de isolatie van het 5D10 V_H -gen werd gebruik gemaakt van primer oligonucleotiden beschreven door Orlandi e.a. (1989) nml. VH1FOR, die reeds aangewend werd voor de aanmaak van het specifiek cDNA, en de VH1BACK primer, die in het FR1-gebied van elk muis V_H -gen bindt.

De sequenties van de primers voor de amplificatie van het V_H -gebied volgens Orlandi e.a. (1989) :

VH1FOR : 5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC-3'

*Bst*II

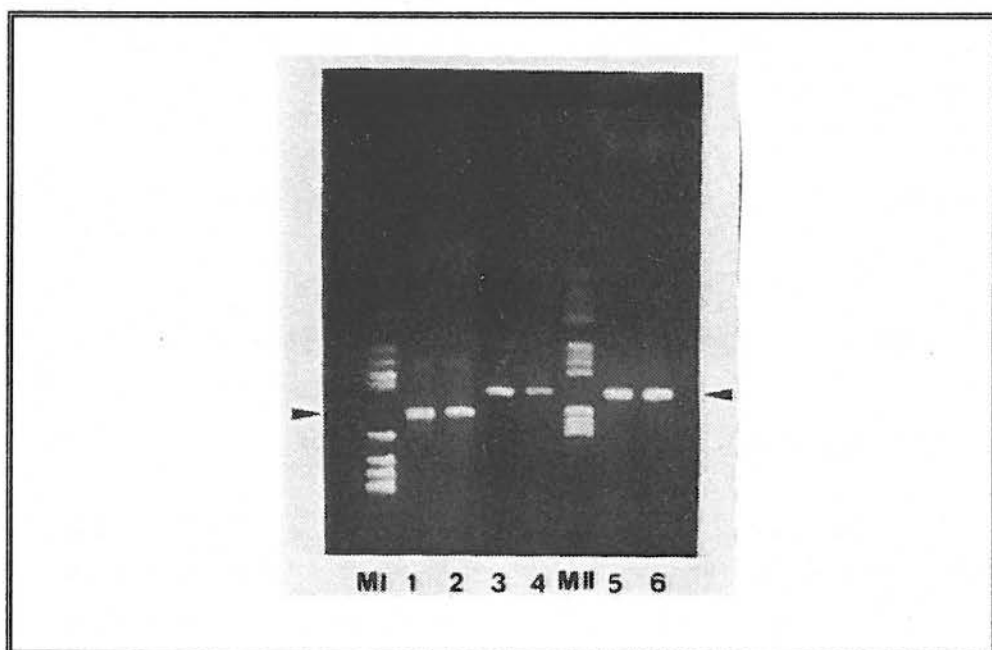
VH1BACK : 5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3'

*Pst*I

met S = C of G; M = A of C; R = A of G; W = A of T

De amplificatie werd uitgevoerd volgens de methode besproken in 2.4. met minimaal 5 μ l cDNA en 25 pmol van elk primer oligonucleotide. Na de PCR-reaktie werd een fractie van het geamplificeerd fragment gescheiden op een 2 % agarose-1,8 % LMP gel. De grootte van het geamplificeerde fragment werd bepaald aan de hand van een moleculaire gewichtsmerker en bedroeg ongeveer 350 bp voor het variabel gebied van de zware keten 5D10V_H (figuur 3.2., 5 en 6).

Figuur 3.2. : De amplificatie van specifiek cDNA gebeurde m.b.v. de PCR-techniek waarbij de genen die coderen voor de variabele gebieden van lichte en zware keten van het 5D10 antilichaam geïsoleerd werden. Scheiding van de PCR-fragmenten op een 2 % agarose-1,8 % LMP gel. **MI** = 1 μ g moleculaire gewichtsmerker Phi 174 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, VS) : 1353-1078-872-603-310-271-234-194-118-72 bp. **1 en 2** : PCR-fragment geamplificeerd met CKFOR en VK leader primers, 440 bp. **3 en 4** : 5D10V_K-gen geïsoleerd met 5D10VKFOR en 5D10VKBACK primers, ongeveer 340 bp. **MII** = 1 μ g moleculaire gewichtsmerker V (Boehringer, Mannheim, D) : 587-540-504-458-434-267-234-213-192-184-124 bp. **5 en 6** : 5D10V_H-fragment geïsoleerd met VHFOR en VHBACK, ongeveer 350 bp.



Het PCR-produkt werd geknipt met *Pst*I en *Bst*EII enzymen. Vervolgens werd het geknipte fragment gescheiden op een 2% LMP gel en na elutie geïnserieerd in de M13VHPCR1-vector die reeds geopend werd met de *Pst*I en *Bst*EII enzymen. In deze eerste kloneringsstap werd het 5D10V_H-gen rechtstreeks ingebouwd in de M13VHPCR1-vector zonder een verschuiving van het leesraam. De M13VHPCR1-vector is tevens voorzien van de immunoglobuline promotor (P) en signaalpeptide sequentie (L). Voor de constructie van de chimere zware keten genen, kan de expressie-cassette met het gekloneerde 5D10V_H-gen door een *Hind*III-*Bam*HI klonering uit de M13VHPCR1-vector verwijderd en overgebracht worden naar een specifieke PSV-*gpt* vector.

Voor de identificatie van het gen werden JM101 *E.coli* cellen getransfecteerd met de M13VHPCR1-faagvector. De getransfecteerde *E.coli* cellen werden uitgeplaat op een agarbodem. Vervolgens werden verzadigde bacterieculturen geïnfecteerd met de bekomen faagplaques. Na een incubatie van 6 uur werd het dsDNA uit de geïnfecteerde cellen geïsoleerd en het ssDNA werd uit het supernatans gehaald volgens de methoden beschreven in 2.9.. De vector met het gekloneerde 5D10V_H-gen kon nu gekarakteriseerd worden aan de hand van sequentie-analysen en restrictie-patronen. De klonering van het 5D10V_H-gen wordt uitvoerig besproken in Hoofdstuk 4 en is schematisch weergegeven in figuur 4.3.

3.5. Amplificatie van het variabel gebied van de lichte keten

De isolatie van het 5D10V_K-gen gebeurde op dezelfde manier als voor het 5D10V_H-gen nml. met behulp van de PCR-techniek. Na de isolatie van het RNA uit de 5D10 hybridomacellen (zie 3.2.) en de synthese van eerste streng cDNA met de VK1FOR primer als initiator voor de reactie (zie 3.3.), werd het 5D10V_K-gen geamplificeerd m.b.v. de PCR-techniek. Voor de isolatie van het variabel gebied van de lichte keten werd de reactie uitgevoerd met minimaal 5 µl cDNA en 25 pmol van elk primer oligonucleotide VK1FOR en VK1BACK, eveneens ontwikkeld door Prof. G. Winter en medewerkers. Beide oligonucleotiden zijn voorzien van enzymatische knipplaatsen om een gemakkelijke klonering toe te laten. VK1FOR bevat de *Bgl*II en VK1BACK de *Pvu*II knipplaats.

De sequentie van de beschreven primers (Orlandi e.a., 1989) voor de isolatie van het lichte keten variabel gebied :

VK1FOR : 5'-GTTAGATCTCCAGCTTGGTCCC-3'

*Bgl*II

VK1BACK : 5'-GACATTGAGCTGACCCAGTCTCCA-3'

*Pvu*II

Na de PCR-reaktie zoals beschreven in 2.4., bleek dat er meerdere fragmenten geamplificeerd werden en de mogelijkheid bestond dat de primers (VK1FOR en VK1BACK) op andere plaatsen in het genoom konden binden en aldus niet geschikt waren voor de isolatie van het 5D10V_K-gen. In de literatuur wordt aangegeven dat voor de amplificatie van sommige genen problemen kunnen optreden (Orlandi e.a., 1989). De beschreven oligonucleotiden blijken te hybridiseren met alle J-gebieden van de muis V-genfamilie (Kabat e.a., 1987), met één uitzondering voor het VK1BACK-oligonucleotide dat weinig complementariteit vertoonde met de sequentie van de V_KII-familie. Daarom werd een meer specifieke primer, CKFOR-primer (S.T. Jones en M.M. Bendig, 1991), die hybridiseert in het muis C_K-gebied in de nabijheid van het J- gebied, gebruikt als initiator voor de cDNA-synthese. Dit primer oligonucleotide is aan het 5'-uiteinde voorzien van een enzymatische knipplaats *Sma*I zodat na amplificatie het fragment gemakkelijk kan gekloneerd worden.

De sequentie van de CKFOR primer (Jones, S.T. en M.M. Bendig, 1991) is als volgt :

5'-GGATCCCGGGTGGATGGTGGTGGGAAGATG-3

*Sma*I

Vervolgens werd de PCR-reaktie uitgevoerd zoals beschreven in 2.4. met 5 µl van het eerste streng cDNA-mengsel en 25 pmol van elke primer oligonucleotide, CKFOR die ook aangewend werd voor de aanmaak van het cDNA, en VK1BACK (Orlandi e.a., 1989). Het geamplificeerde fragment werd na restrictie met de *Sma*I en *Pvu*II enzymen gescheiden op een 2% LMP gel. Het fragment werd na elutie gekloneerd in een M13-vector (*Sma*I/ *Pvu*II) (Boehringer, Mannheim, D) en in sequentie gebracht. Hieruit bleek echter dat het 5D10V_K-gebied slechts gedeeltelijk werd geïsoleerd. Dit was te wijten aan de niet-specifieke binding van het VK1BACK oligonucleotide in het FR2-gebied van het 5D10V_K-gen. Tevens verschilde de sequentie van het ander gebruikte oligonucleotide, VK1FOR (Orlandi e.a., 1989) op menige plaatsen van de sequentie van het J-gebied van het 5D10V_K-gen (klasse II). Het bleek niet mogelijk het 5D10V_K-gen volledig te isoleren met de Ig-specifieke oligonucleotiden beschreven door Orlandi e.a. (1989).

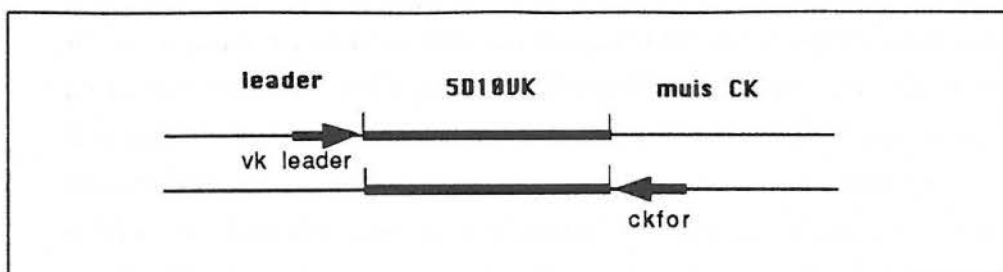
Het onvolledige 5D10V_K-fragment kon geklasseerd worden volgens Kabat e.a. (1987) in de V_KII-klasse, zodat het gen kon geamplificeerd worden met oligonucleotiden beschreven door Jones S.T. en M.M. Bendig (1991). De eerste PCR-reaktie werd doorgevoerd met het CKFOR oligonucleotide dat hybridiseert aan het muis constante kappa gebied; en het VK leader oligonucleotide dat hybridiseert aan de leader sequentie van het muis kappa (klasse II) gebied.

Figuur 3.3. : De sequentie van de primer oligonucleotiden VK leader en CKFOR (Jones M.T. en M.M. Bendig, 1991) voor de isolatie van het V_K-gen. De plaatsen waar de oligonucleotiden binden in het genoom zijn weergegeven in het schema onderaan.

VK leader : 5'-ACTAGTCGACATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG-3'

CKFOR : 5'-GGATCCCGGGTGGATGGTGGGAAGATG-3'

*Sma*I



De sequenties van de oligonucleotiden voor de isolatie van het V_K -gen volgens Jones M.T. en M.M. Bendig (1991) zijn weergegeven in figuur 3.3. evenals de plaatsen waar de primers hybridiseren in het genoom voor de isolatie van het 5D10 V_K -gen. Na amplificatie werd een fractie van het PCR-mengsel op 2 % agarose-1,8 % LMP gel gescheiden en werd de grootte van het fragment bepaald : ongeveer 450 bp (Figuur 3.2., a en b). Het fragment werd geëluëerd uit een 1,2 % LMP gel en gebruikt voor een volgende PCR-reaktie.

De tweede PCR-reaktie om het V_K -gen te isoleren en te voorzien van de juiste knipplaatsen, werd uitgevoerd met 25 pmol van ieder oligonucleotide, 5D10VKFOR en 5D10VKBACK, en 50 ng van het opgezuiverd DNA geamplificeerd in de eerste PCR-reaktie. De nucleotide-sequenties van de gebruikte oligonucleotiden vertoonden gelijkenissen met de sequenties van de VK1FOR en VK1BACK oligonucleotiden beschreven door Orlandi e.a. (1989) maar werden aan hun 3'-uiteinde aangepast aan de terminale sequenties van het muis V_K -II-klasse (Kabat e.a., 1987).

De sequenties van de primers die gebruikt werden in de tweede PCR-reaktie zijn als volgt :

5D10 VKFOR : 5'-CCGTTTGATCACCAACGCTGTCCC-3'

*Bcl*II

5D10 VKBACK : 5'-GACGTCCAGCTGGACCCAGACCCCA-3'

*Pvu*II

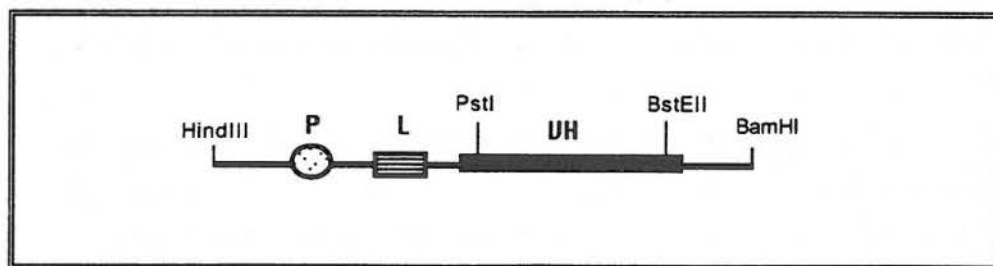
Beide oligonucleotiden zijn voorzien van een enzymatische knipplaats, *Bcl*I voor 5D10VKBACK en *Pvu*II voor 5D10VKFOR, zodat na amplificatie het fragment gemakkelijk kan gekloneerd worden in een vector. De PCR-reaktie werd uitgevoerd zoals beschreven in 2.4. en na scheiding van het staal op een gelelektroforese verscheen een PCR-fragment van ongeveer 340 bp (figuur 3.2.,c en d). Het 5D10V_K-fragment werd geknipt met de *Bcl*I en *Pvu*II enzymen en werd na elutie uit een 1,2% LMP gel geïnserieerd in een vector. Vervolgens werd het 5D10V_K-gen gekarakteriseerd aan de hand van sequentie-analysen. De klonering van het 5D10V_K-fragment wordt besproken in Hoofdstuk 4 en is weergegeven in figuur 4.5.

3.6. Karakterisatie van het variabel gebied van de zware keten

3.6.1. De M13VHPCR1-vector

De M13VHPCR1-vector werd ons ter beschikking gesteld door Prof. G. Winter (MRC, Cambridge). Deze vector bevat een expressiecassette bestaande uit de Ig-promotor (P) en Ig-sigtaalpeptide sequentie (L) die de expressie drijven, en een V_H-regio met de *Pst*I en *Bst*EII restrictie plaatsen in posities overéénkomend met deze van *Pst*I en *Bst*EII van de primer sequenties (VH1FOR en VH1BACK) van het geamplificeerde V_H-gebied.

Figuur 3.4. : De expressiecassette van de M13VHPCR1-vector (*Hind*III-*Bam*HI fragment) is opgebouwd uit een Ig-promotor (P), een signaalpeptide sequentie (L) en een V_H-gebied met de *Pst*I en *Bst*EII knipplaatsen.



De expressiecassette kan uit de vector verwijderd worden door de vector te knippen met de restrictie-enzymen *Hind*III en *Bam*HI. Het *Hind*III-*Bam*HI fragment is weergegeven in figuur 3.4.

3.6.2. Klonering van het variabel gebied van de zware keten in de M13VHPCR1-vector

Het 5D10V_H-gen werd uit de hybridomacellen geïsoleerd met behulp van de PCR-techniek (zie 3.4.). Het gen werd geknipt met de restrictie-enzymen *Pst*I en *Bst*EII en geïnsereerd in de *Pst*I-*Bst*EII geopende M13VHPCR1-vector (Figuur 4.3). Na de opzuivering van het faag-DNA werden *E.coli* cellen (JM101) getransfecteerd met de faagvector en uitgeplaat op agarbodem (zie 2.8.). De bekomen faagplaques werden uitgedrukt met een steriele tip en samengevoegd met verzadigde *E.coli* (JM101) culturen. Het faag dsDNA werd uit de cellen geïsoleerd met de methode beschreven in 2.9. en geknipt met restrictie-enzymen, de bekomen fragmenten werden geanalyseerd met gelelektroforese. Het faag ssDNA werd uit het supernatans neergeslagen en gebruikt voor sequentie-analysen (zie 2.10). De sequentie van het 5D10V_H-insert werd bepaald, daar in de afgeleide aminozuursequentie geen "stop" signaal voorkwam, kunnen we besluiten dat een intact variabel gebied gevormd werd.

Het 5D10V_H-fragment bevat niet de exacte sequenties aan de 5'- en 3'-uiteinden vermits de gebruikte "primers" niet de exacte maar wel de meest voorkomende sequenties voor alle V_H-gebieden bevatten (Orlandi e.a., 1989). Tevens werd het 5D10V_H-fragment in het leesraam van de M13VHPCR1-vector gekloneerd waardoor de 5 eerste aminozuren van het FR1-gebied en de 5 laatste aminozuren van FR4-gebied identiek zijn aan deze van het gekloneerde V_H-gen. De nucleotide-sequentie en afgeleide aminozuur-samenstelling van het 5D10V_H-gebied zijn weergegeven in figuur 3.5..

Het 5D10V_H-fragment is 351 bp lang en codeert voor 117 aminozuren. De aminozuursequentie van het 5D10V_H-fragment kan nu vergeleken worden met aminozuursequenties van variabele gebieden van andere muis antilichamen die geklasseerd werden door Kabat e.a. (1987). De klonering van het 5D10V_H-gen wordt besproken in Hoofdstuk 4 en is weergegeven in figuur 4.3.

Figuur 3.5. : De posities van roosterwerk (FR) en hypervariabele gebieden (CDR) zijn aangeduid. De onderstreepte sequenties zijn deze van de primer VH1FOR en het complement van VH1BACK waarin respectievelijk de unieke restrictieknipplaatsen *Pst*I en *Bst*EII bevinden. Het J- en D-segment zijn onderlijnd in stippelijnd.

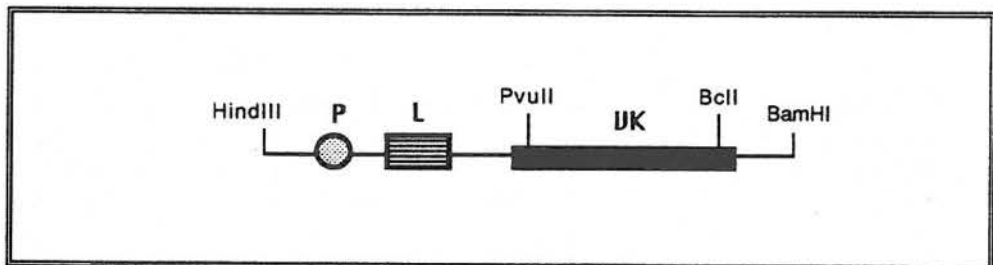
<i>Pst</i> I															
CAG	GTC	CAA	<u>CTG</u>	<u>CAG</u>	CAG	TCT	GGA	CCG	GAG	CTG	AAG	AAG	CCT	GGA	GAG
Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	K	K	P	G	E
FR1															
ACA	GTC	AAG	ATC	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGG	TAC	ACC	TTC	ACA/GAC	TAT	
T	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y
CDR1								FR2							
GGA	ATG	AAC/TGG	GTG	AAG	CAG	GCT	CCA	GGA	CAG	GGT	TTA	AAG	TGG	ATG	
G	M	N	W	V	K	Q	A	P	G	Q	G	L	K	W	M
CDR2															
GGC/TGG	ATA	AAC	ACC	TAC	ACT	GGA	GAG	TCA	ACA	TAT	GTT	GAT	GAC	TTC	
G	W	I	N	T	Y	T	G	E	S	T	Y	V	D	D	F
FR3															
AAG	GGA/CGC	TTT	GTC	TTC	TCT	TTG	GAA	ACC	TCT	GCC	AGT	GCT	GCC	TAT	
K	G	R	F	V	F	S	L	E	T	S	A	S	A	A	Y
FR3															
TTG	CAG	ATC	AAC	AAC	CTC	AAA	AAT	GAG	GAC	ACG	GCT	ACA	TAT	TTC	TGT
L	Q	I	N	N	L	K	N	E	D	T	A	T	Y	F	C
CDR3								FR4							
GCA	AGA/AGG	GGT	TTT	TAT	GCT	ATG	GAC	TAC/TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG		
A	R	R	G	F	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	T
-----/-----															
<u>D</u>								<u>J4</u>							
<i>Bst</i> III															
<u>GTC</u>	<u>ACC</u>	<u>GTC</u>	<u>TCC</u>	<u>TCA</u>											
V	T	V	S	S											

3.7. Karakterisatie van het variabel gebied van de lichte keten

3.7.1. De M13VKPCR1-vector

De M13VHPCR1-faagvector werd ons toegestuurd door Prof. G. Winter (MRC, UK). Deze vector bevat de Ig-promotor (P) en de Ig-sigtaal peptide (L) sequentie die de expressie drijven, en een V_K -regio (Riechmann e.a., 1988) met *PvuII* en *BclII* restrictieplaatsen in posities die overéénkomen met de *PvuII* en *BclII* in de sequenties van de oligonucleotiden (5D10VKFOR en 5D10VKBACK) gebruikt voor de amplificatie van het 5D10 V_K -gen. Het *BclII* enzyme knipt uitsluitend als de adenine residu's in deze restrictieplaats (TGATCA) niet gemethyleerd zijn. Om de M13VKPCR1-faagvector te kunnen gebruiken was het noodzakelijk te werken met dam-negatieve *E.coli* cellen. Het *HindIII*-*BamHI* fragment van de faagvector werd overgebracht naar een specifieke PUC19-vector waaruit de *PvuII* restrictieplaatsen werden verwijderd waardoor ds-sequentie mogelijk werd. Het *HindIII*-*BamHI* fragment of de expressie-cassette voor de lichte keten is schematisch weergegeven in figuur 3.6..

Figuur 3.6. : De expressiecassette van de lichte keten is opgebouwd uit een Ig-promotor (P), een signaalpeptide-sequentie (L) en een muis V_K -gen met de *BclII* en *PvuII* knipplaatsen.



3.7.2. Klonering van het variabel gebied van de lichte keten

Het 5D10 V_K -gen werd uit de 5D10 hybridomacellen geïsoleerd m.b.v. de PCR-techniek. De gebruikte oligonucleotiden waren CKFOR en VK1BACK en de reactie

werd uitgevoerd zoals beschreven in 2.5.. Het geamplificeerde fragment werd geknipt met de enzymen *PvuII* en *SmaI* en gekloneerd in een M13-vector die reeds geopend werd met *SmaI* (Boehringer, Mannheim, D). Vervolgens werden *E.coli* cellen (JM101) getransfecteerd met deze faagvector zoals beschreven in 2.8. Na het uitplaten van de cellen op agarbodem, werden faagplaques zichtbaar. De faagplaques werden uitgeprikt met een steriele tip en samengevoegd met verzadigde *E.coli* culturen (JM101). De cellen werden minstens 6 uur al schuddend geïncubeerd bij 37°C en vervolgens werd het faag dsDNA uit de cellen geïsoleerd volgens de methode beschreven in 2.9. Het faag DNA werd geknipt met enzymen (*HindIII* en *BamHI*, of *PvuII* en *SmaI*) en na gelelektroforese geanalyseerd.

Het faag ssDNA werd uit het supernatans neergeslagen (zie 2.9.) en werd gekarakteriseerd aan de hand van sequentie-analysen met de dideoxymethode. Hieruit bleek dat het variabel gebied niet intact was, het VK1BACK primer oligonucleotide hybridiseerde in het FR2-gebied van het 5D10V_K-fragment waardoor de FR1- en CDR1-gebieden ontbraken. Het insert kon ondergebracht worden in klasse II van de muis immunoglobulinen volgens Kabat e.a. (1987).

Als controle werd ook de nucleotide sequentie van het VK1FOR primer oligonucleotide (Orlandi e.a., 1989) vergeleken met de nucleotide sequentie van FR4 (AZ 100 tot 107). Daaruit konden we afleiden dat er zich op 7 plaatsen geen complementariteit voordeed tussen het primer oligonucleotide en dat gebied zoals hieronder weergegeven.

VK1FOR : 3'-CCCTGGTTCGACCTCTAGATTG-5'

***** * ***** ** ***

sequentie 5D10VK : 5'-GGGACAGCGTTGGAAATAAAAC 3'

De complementariteit tussen beide primers is weergegeven door een *.

De nucleotide sequentie en aminozuursamenstelling van het insert zijn in figuur 3.6. weergegeven.

Figuur 3.6. : De onderstreepte sequenties zijn deze van de primer VK1BACK en het complement van de CKFOR primer. De hypervariabele gebieden (CDR) en de geconserveerde regio's (FR) werden aangeduid.

<u>SmaI/PvuII</u>						FR2				CDR2				
<u>CCC CTG</u>	ACC	CAG	TCT	CCA		GAA	CTC	GTC	ATC	TAC/AAA	GTT	TCC	ACC	CGA
P	L	T	Q	S	P	E	L	L	I	Y	K	V	S	N R
FR3														
TTT	TCT/GGG	GTC	CCA	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	ACC
F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T T
FR3														
TTC	ACA	CTT	AAG	ATC	GCC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	CTG	GGA	ATC TAT
F	T	L	K	I	A	R	V	E	A	E	D	L	G	I Y
CDR3							FR4							
TTC	TGC	/TCT	CAA	AGT	ACA	CAT	GTT	CCA	TTC	ACG/TTC	GGC	TCG	GGG	ACA
F	C	S	Q	S	T	H	V	P	F	T	F	G	S	G T
FR4														
GCG	TTG	GAA	ATA	AAA/CGG	GCT	GAT	GCT	GCA	CCA	ACT	GTA	TCC	ATC	TTC
A	L	V	I	K R	A	D	A	A	P	T	V	S	I	F
<u>SmaI</u>														
CCA	CCA	TC	C	ACC	CGG	G								

Beide primer oligonucleotiden VK1BACK en VK1FOR, beschreven door Winter en medewerkers (Orlandi e.a., 1989), bleken niet geschikt voor de isolatie van ons gen waardoor we gedwongen waren het gen op een andere manier te isoleren, namelijk door twee opéénvolgende PCR-reakties (3.5.).

Na de amplificatie reacties werd het 5D10V_K-fragment geknipt met de enzymen *Bcl*I en *Pvu*II en gescheiden op een 1,2% LMP gel. Na elutie werd het gen gekloneerd in de PEGVK-vector die reeds geopend werd met *Bcl*I en *Pvu*II (Figuur 4.6.). Vervolgens werd de vector met het gekloneerde gen getransfecteerd in competente *E.coli* cellen volgens de methode beschreven in 2.8.. De getransfecteerde cellen werden uitgeplaat op agarbodem en na een incubatie van 24 uur bij 37°C werden de kolonies zichtbaar. De kolonies werden met een steriele tip verwijderd en opgegroeid in LB-medium. Het dsDNA werd uit de cellen geïsoleerd met de methode beschreven in 2.9.. Na het denatureren van het dsDNA werd het gebruikt voor sequentie-analysen (zie 2.10). Na de sequentie analyse met de dideoxymethode werd een intact variabel gebied geïsoleerd. De volledige nucleotidesequentie en aminozuursamenstelling van het variabel gebied van de 5D10 lichte keten werd weergegeven in figuur 3.7..

Het geïsoleerde 5D10V_K-gen is 342 bp lang en codeert voor 114 aminozuren maar bevat niet de exacte nucleotide sequenties aan de uiteinden van het variabel gebied vermits de gebruikte oligonucleotiden niet de exacte maar wel de meest voorkomende sequentie bevatten. Het 5D10VKFOR primer oligonucleotide verschilde slechts op 3 plaatsen van de natuurlijke sequentie van het 5D10V_K-fragment :

5D10VKFOR primer	:	5'-CCCTGTCGCAACCACTAGTTTG-5'
		***** ** *
sequentie 5D10VK	:	5'-GGGACAGCGTTGGAAATAAAAC-3'

De complementariteit tussen beide primers werd voorgesteld door een *.

De aminozuursequentie van het V_K-gen kan nu vergeleken worden met de aminozuursequenties van de lichte keten variabele gebieden van muis antilichamen geklasseerd door Kabat e.a. (1987).

Figuur 3.7. : De volledige nucleotidesequentie van het gekloneerde 5D10V_K-gen. De geconserveerde (FR) en hypervariabele (CDR) gebieden werden aangeduid. De onderstreepte sequenties zijn deze van de 5D10VKBACK oligonucleotide en het complement van de 5D10VKFOR primer. Het "Joining"gebied werd met stippelijnd. onderlijnd.

PvuII										FR1									
<u>GAC</u>	<u>ATC</u>	<u>CAG CTG</u>	<u>ACC</u>	<u>CAG</u>	<u>ACC</u>	<u>CCA</u>	<u>CTC</u>	<u>TCC</u>	<u>CTG</u>	<u>CCT</u>	<u>GTC</u>	<u>AGT</u>	<u>CTT</u>	<u>GGA</u>					
D	I	Q	L	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G				
CDR1																			
GAT	CAG	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC/AGA	TCT	AGT	CAG	AGC	CTT	GTA	CAC	GAT					
D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V	H	D				
FR2																			
AAT	GGA	ATC	ACC	TAT	TTA	CAT/TGG	TAC	CTC	CAG	AAG	CCA	GGT	CAG	TCT					
N	G	I	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S				
CDR2																			
CCA	GAA	CTC	CTG	ATC	TAC/AAA	GTT	TCC	AAC	CGA	TTT	TCT/GGG	GTC	CCA						
P	E	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P				
FR3																			
GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	ACC	TTC	ACA	CTT	AAG	ATC				
D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	T	F	T	L	K	I				
FR3																			
GCC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	CTG	GGA	ATC	TAT	TTC	TGC/TCT	CAA	AGT					
A	R	V	E	A	E	D	L	G	I	Y	F	C	S	Q	S				
CDR3								FR4								BglII/BclI			
<u>ACA</u>	<u>CAT</u>	<u>GTT</u>	<u>CCA</u>	<u>TTC</u>	<u>ACG/TTC</u>	<u>GGC</u>	<u>TCG</u>	<u>GGG</u>	<u>ACA</u>	<u>GCG</u>	<u>TTG</u>	<u>GTG ATC</u>	<u>AAA</u>						
T	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	A	L	V	I	K				

joining J_K⁴																			
<u>CGT</u>	<u>GCT</u>																		
R	A																		

3.8. Klasse indeling van de V-gebieden

Kabat en medewerkers (1987) maakten een klassificatie van de variabele gebieden op basis van de aminozuursamenstelling van de roostergebieden. De variabele gebieden van de muis zware ketens werden opgedeeld in 5 groepen met als onderverdeling A, B of C : IA, IB, IIA, IIB, IIC, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, VA, VB. Deze van de muis lichte ketens werden onderverdeeld in 7 groepen : I, II, III, IV, V, VI, VII. Elk variabel gebied kan ondergebracht worden in een dergelijke klasse waarbij zich soms kleine variaties kunnen voordoen.

Het exon dat codeert voor het variabel gebied van de zware keten bestaat uit 3 segmenten : het Variabel (V_H), "Diversity" (D) en "Joining" (J_H) segment. Voor de muis immunoglobuline genen bestaan er in totaal 12 verschillende D- en 4 J_H -segmenten. Het exon dat codeert voor het variabel gebied van de lichte keten is opgedeeld in een Variabel (V_L) en een "Joining" (J_L) segment die direct met elkaar verbonden zijn. De muis V_L Ig-familie bevat 5 verschillende J_L segmenten.

3.8.1. Het zware keten 5D10 V_H -gen

Het gekloneerd 5D10 V_H -gen is in totaal 351 bp lang en codeert voor 117 aminozuren. De aminozuursequentie van het fragment vertoonde de meeste homologie met klasse IIA volgens de indeling van Kabat e.a. (1987). Het 5D10 V_H -gen werd ingedeeld in structurele gebieden : Roosterwerkgebieden (FR1, FR2, FR3, FR4) en hypervariabele gebieden (CDR1, CDR2, CDR3). Er zijn geen fouten in het leesraam zodat dit gen waarschijnlijk codeert voor het variabel gebied van de zware keten van het 5D10 antilichaam.

De overéénkomst tussen de AZ-sequentie van 5D10 V_H en V_H -klasse II(A) van de muis immunoglobulinen werd weergegeven door *. Wanneer het AZ in de klasse werd voorgesteld door een kleine letter, kon dit AZ in het V_H -gebied variëren. Het 5D10 V_H -gebied volgde niet de volledige consensus, t.o.v. klasse IIA zijn er in totaal 11 verschillen. Deze verschillen kwamen voor op plaatsen in de sequentie die mochten variëren. Het variabel gebied is opgedeeld in 3 segmenten : het V-, D- en J_H -segment

waarbij de sequentie van het J_H-segment de consensus van J_H4 (Kabat e.a., 1987) het meest volgde (figuur 3.5.).

Aminozuur homologie tussen het 5D10V_H-fragment en de consensus van klasse IIA werd weergegeven :

		CDR1
5D10V _H	:	QVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYGMMNVKQAPGQGLKWM
		***** ** ** * ** * ** * ** * ** * * *
klasseII (A)	:	-VQLQQSg-elvkpGasVk-sCk-sgy-F-----WV-q--g--l-wi
		CDR2
5D10V _H	:	GWINTYTGESTYVDDFKGRFVFSLETSASAAYLQINNLIKNETATYFC
		* * * * * ** * * * * * * * * * *
klasseII (A)	:	G-I----g---Y---Fk-k-v-t---Ssta-m-----L-sEds--y-C
		CDR3
5D10V _H	:	ARRGFYAMDYWGQGTTVTVSS
		** * * * *
klasseII (A)	:	AR-----wG-GT--TVS-

3.8.2. Het lichte keten 5D10V_K- gen

Het 5D10V_K-gen is 342 bp lang en codeert voor 114 aminozuren. De aminozuursequentie vertoonde de meeste gelijkenis met deze van V_K-klasse II van de muis immunoglobulinen volgens Kabat e.a.(1987).

Aminozuurhomologie tussen 510V_K en de consensus van klasse II :

		CDR1
5D10V _K	:	DIQLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHDNGITYLEHWYLQKPG
		* ** * * * * * * * * * *
klasse II:	:	d---Tq-----v--G---SisC-s-----g-tYL-W-lq-pg

CDR2

5D10V_K : QSPELLIYKVSNRFSGVPDFRSGSGSGTTFTLKIARVEAEDLGIYF
*** * * * * *** * * * * * * * * * * * *
klasse II: Qsp--l-y--S---sGV-DRF-gsgsgTdFtL-lsrV-aed-g-y-

CDR3

5D10V_K : CSQSTHVPFTFGSGTALVIKRA
* * * * * * * * * *
klasse II: C-----P-TFG-GTKLE-KRA

De aminozuursequentie van 5D10V_K vertoonde geen leesraamfouten en verschilde slechts op drie plaatsen t.o.v. de consensus van klasse II. Twee verschillen kwamen voor op plaatsen die mochten variëren. Het derde verschil deed zich voor op een plaats die toegewezen is aan één enkel aminozuur. Door het creëren van een *BclI* restrictieplaats in het 5D10VKFOR oligonucleotide werd AZ 105 een valine (V) vervangen door een glutamaat (E). Het J-gebied vertoonde zijn hoogste graad van homologie met de sequentie van J_K4 (figuur 3.7.).

3.9. Bespreking

De variabele gebieden van het 5D10 antilichaam staan in voor de binding aan het antigeen van de MCF-7 borstkankercellen. De genen die coderen voor deze variabele gebieden, 5D10V_K en 5D10V_H, werden m.b.v. de PCR-techniek (Saiki e.a., 1987) met succes uit de 5D10 hybridomacellijn geïsoleerd. Hiervoor werd specifiek cDNA aangemaakt met immunoglobuline specifieke oligonucleotiden beschreven door Orlandi e.a. (1989). Door de aspecifieke binding van het VK1BACK oligonucleotide in FR2 van het V-gebied, kon slechts een deel van het gen geïsoleerd worden. Het 5D10V_K-gebied werd uiteindelijk geamplificeerd met de oligonucleotiden die hybridiseren met de sequentie van het constant κ -gebied en de leader sequentie (klasse II) van de lichte keten (Jones en Bendig, 1991) gevolgd door een tweede PCR-reaktie.

Het geïsoleerde gen was intact. Het 5D10V_H-gen kon geïsoleerd worden met de Ig-specifieke oligonucleotiden beschreven door Orlandi e.a. (1989).

Beide genen waren intact en werden in het leesraam van specifieke M13-expressievectoren gekloneerd. De aminozuursequentie van beide V-gebieden werd vergeleken met deze volgens de klassering van Kabat e.a. (1987). De aminozuursequentie van de zware keten vertoonde de meeste homologie met deze van klasse II(A), J_H4 terwijl de sequentie van de lichte keten de meeste gelijkenis vertoonde met deze van klasse II, J_K4. Deze resultaten leveren de genen die coderen voor de V-gebieden van het 5D10 antilichaam,

Voor de constructie van het chimeer antilichaam worden in een volgende fase de variabele gebieden gekoppeld aan de constante gebieden van een humaan antilichaam, door overbrenging van de expressie-cassette naar een specifieke PSV-vector.

HOOFDSTUK 4 : CONSTRUCTIE VAN HET MUIS/MENS CHIMEER

4.1 Inleiding

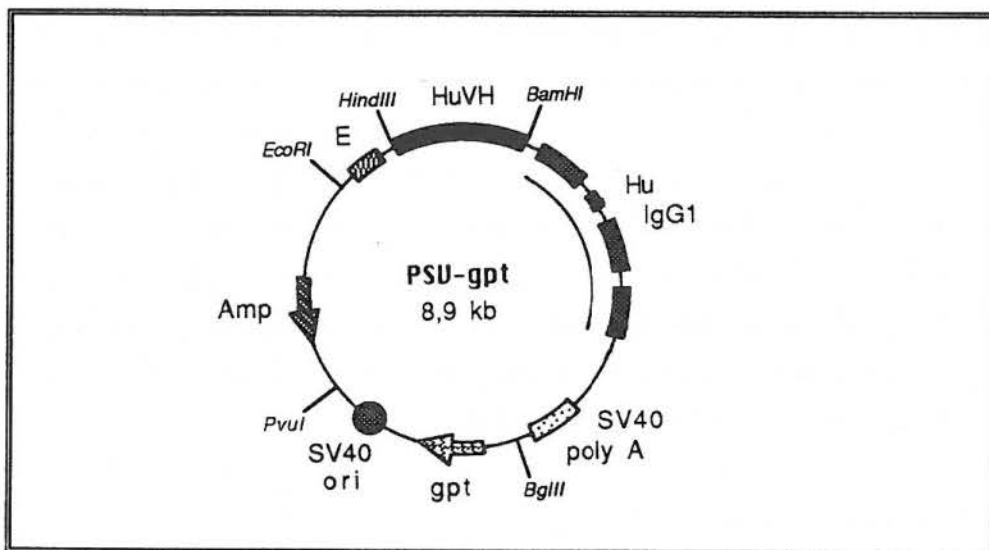
De volgende stap voor de constructie van het chimeer antilichaam is de aanéenschakeling van de V-genen van het 5D10 muis antilichaam aan de overéénkomstige C-genen van een humaan antilichaam. De groep van Winter en medewerkers (MRC, Cambridge) construeerden gespecialiseerde vectoren voor de aanmaak en expressie van antilichaamgenen in niet-producerende myelomacellen zoals de PSV-*gpt* en PSV-*hyg* vector (Orlandi e.a., 1989). Het gebruik van deze expressievectoren maakt het mogelijk chimere antilichamen op een eenvoudige manier te construeren en tot expressie te brengen. Deze PSV-vectoren bestaan uit 3 gebieden : een eerste gebied is nodig voor de selectie en replicatie van de vectoren in *E. coli* cellen, het tweede gebied dient voor de selectie in dierlijke cellen en het derde gebied bevat de sequenties van de antilichaamgenen. Riechmann en medewerkers (1988) selecteerden het humaan IgG1-isotype voor de constructie van chimere of gehumaniseerde antilichamen. Zij toonden aan dat dit isotype het meest lytisch effect vertoonde in cel-gemedieerde lyse en complement fixatie wanneer het antigeen veelvuldig voorkomt op de celwand zoals dit het geval is met het 5D10-antigeen op de MCF-7 cellen (Sandlie e.a., 1991). Voor de constructie van de chimere lichte keten werd het humane kappa gen genomen (Hieter e.a., 1980).

4.2. De expressievectoren

A.) De PSV-*gpt* (Alys30) vector werd bekomen van Prof. G. Winter en dient voor de expressie van de chimere zware keten. Deze plasmide constructie is van genomische oorsprong en bevat het humane V_H -gen, dat als een *HindIII*-*BamHI* fragment (HuV_H) kan verwijderd worden. De vector is eveneens voorzien van de sequentie die codeert voor humaan IgG1 gamma (Honjo e.a., 1979) ($Hu\ IgG1$). Het gen werd als een *BamHI*-*BamHI* fragment in de vector gekloneerd waarna de tweede *BamHI*

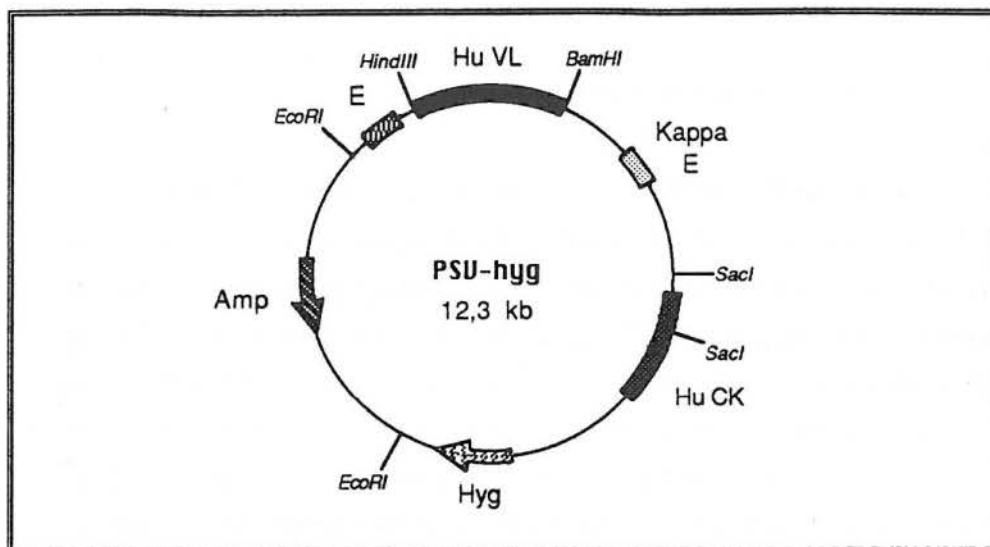
knipplaats m.b.v. mutagenese werd verwijderd door Dr. T. Bush (MRC, Cambridge, UK). De Ig-"enhancer" (E) werd aan het 5'-uiteinde van het variabel gebied geïnserieerd en de vector werd voorzien van het *E.coli gpt*-gen als dominante selectiemerker (*gpt*) (zie figuur 4.1.).

Figuur 4.1 : Weergave van de PSV-*gpt* (Alys30) expressievector (8,9 kb) met Ig-"enhancer" (E) aan het 5'-uiteinde van het variabel gebied; het humane V_H -gen (hu V_H) dat als een *HindIII*-*BamHI* fragment uit de vector kan verwijderd worden en de sequentie die codeert voor humaan C-gamma (hu IgG1). De selectie van *E.coli* cellen gebeurt door het ampicilline resistentie-gen (Amp), en de selectie van SP2/0 cellen met het *E.coli gpt*-gen.



B.) De PSV-*hyg* (Alys17) expressievector dient voor de expressie van de chimere lichte keten en bevat het humane V_L -gen als een *HindIII*-*BamHI* fragment (Hu V_L), het gen voor het humaan constant kappa gebied (Hieter e.a., 1980) (Hu C_K), een Ig-"enhancer" (E) en een hygromycine selectiegen (*hyg*) waardoor eukaryote cellen, na transfectie, resistent worden voor dit antibioticum (zie figuur 4.2.).

Figuur 4.2. : Weergave van de PSV-*hyg* expressievector (12,3 kb) met het humane C_k en V_L -gen, de Ig-"enhancer" (E) en het hygromycine selectie-gen (*hyg*).



Beide humane V-genen (V_H en V_L) kunnen uit de PSV-vectoren verwijderd worden door een *HindIII-BamHI* restrictie en vervangen worden door de expressiecassettes met de gekloneerde muis V-genen uit de M13-vectoren. Op deze manier worden de muis V-genen door een niet-coderend gebied aan de C-genen gekoppeld en worden intacte chimere genen verkregen.

4.3. De constructie van de chimere ketens

Na de amplificatie van de V-genen uit de 5D10 producerende cellijn m.b.v. Ig-specifieke oligonucleotiden, werden de V-genen gekloneerd in M13-vectoren (Hoofdstuk 3). Deze M13-vectoren zijn voorzien van de Ig-promotor en de Ig-sigtaalpeptide sequentie, die de expressie bevorderen. De expressiecassette met het gekloneerde V-gen werd met de *HindIII* en *BamHI* enzymen uit de M13-vector geknipt en overgebracht naar de overeenkomstige PSV-vector d.w.z. het V_K -gen naar de PSV-*hyg* vector en het V_H -gen naar de PSV-*gpt* vector. Vermits de PSV-*hyg* voorzien is van

het humaan C_k-gen (Hieter e.a., 1980) en PSV-*gpt* van het humaan IgG1 gebied (Honjo e.a., 1979), worden hierdoor de variabele genen door een niet-coderend gebied (intron) aan de constante gebieden van het humaan antilichaam gekoppeld.

4.3.1. De constructie van de chimere zware keten

Het geamplificeerde 5D10V_H-fragment (351 bp) werd in de M13VHPCR1 vector gekloneerd (3.6., zie figuur 4.3.A.). Voor de constructie van de chimere zware keten werd de expressiecassette (Ig-promotor en signaalpeptide sequentie) met het gekloneerde 5D10V_H-gen uit de M13VHPCR1 vector verwijderd door een *Hind*III-*Bam*HI restrictie en overgebracht naar de PSV-*gpt* vector. Deze klonering kon slechts plaats vinden wanneer eerst het humane V_H-gen (1,9 kb) uit de PSV-*gpt* vector verwijderd was, dit gebeurde door de vector te openen met dezelfde enzymen als voorheen nml. *Hind*III-*Bam*HI. Vervolgens werd de expressiecassette met het gekloneerde 5D10V_H-gen (820 bp) overgebracht naar de geopende PSV-*gpt* vector (figuur 4.3.B). Hierbij werd het muis variabel gebied van de zware keten 5D10V_H door een niet-coderend gebied aan het humaan gamma-1 gen gekoppeld. Uiteindelijk werd de PSV-5D10V_H vector bekomen waarin de 3 verschillende gebieden, de Ig-promotor (P) en signaalpeptide-sequentie (L), het muis variabel gebied en het humaan constant gebied, met elkaar werden verbonden.

De laatste kloneringsstap is in detail weergegeven in figuur 4.4.. Na de ligatie-reactie werden *E.coli* cellen (HB101) getransformeerd met het construct. De bekomen kolonies werden uitgepikt en opgegroeid in LB-medium in aanwezigheid van ampicilline (zie 2.9.). Na de bereiding van het dsDNA werd het 5D10V_H-gen gekarakteriseerd en geverifieerd op oriëntatie. De sequentie van het gekloneerde humaan IgG1 constant gebied werd bepaald en vergeleken met deze beschreven door Ellison e.a. (1982).

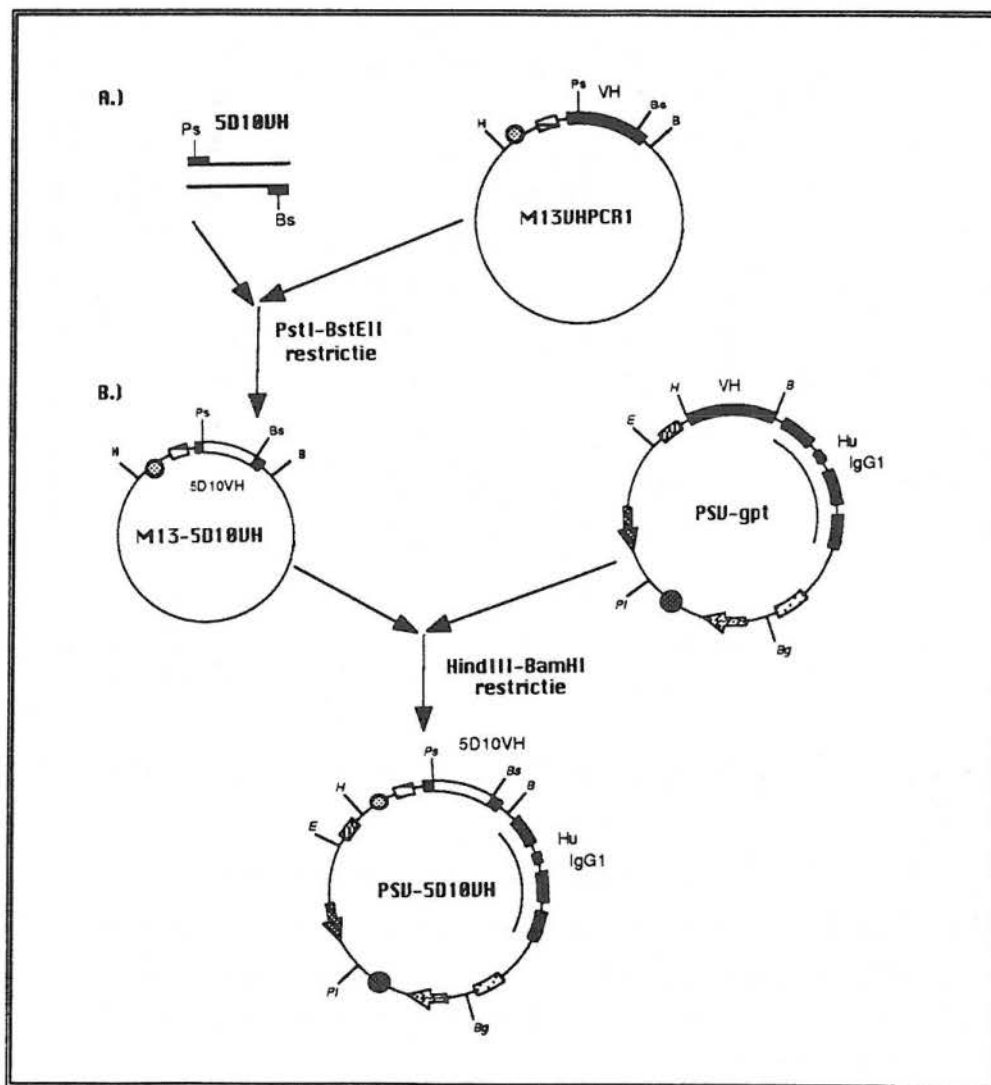
Voor een grote aanmaak van de expressievector PSV-*gpt* (Alys30), voorzien van de chimere zware keten, werd de vector getransformeerd in *E.coli* cellen (HB101). Na de isolatie van de kolonies van de agarbodem, werden de kolonies opgegroeid.

Figuur 4.3. : Klonerigsschema van het 5D10V_H-gen in de PSV-*gpt* expressievector.

A.) Klonering van het geamplificeerde 5D10V_H-gen in de M13VHPCR1 vector na restrictie van fragment en vector met *Pst*I en *Bst*EII.

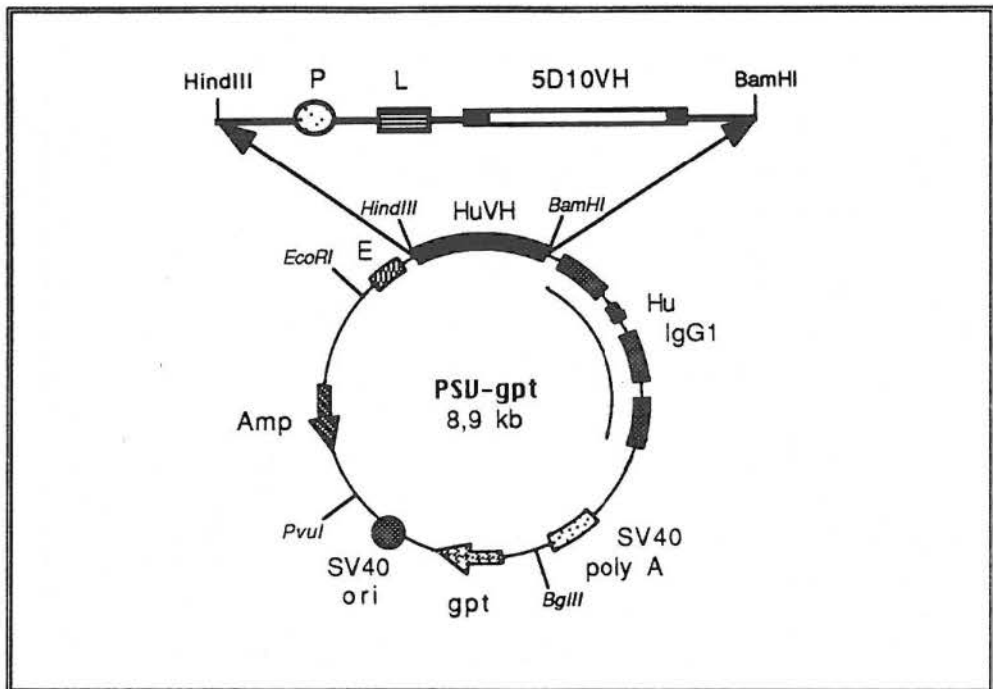
B.) Klonering van de expressiecassette met het 5D10V_H-gen in de PSV-*gpt* expressievector na restrictie van beide vectoren met *Hind*III en *Bam*HI.

De restrictieplaatsen werden afgekort als volgt : *Hind*III =H ; *Bam*HI =B ; *Bst*EII = Bs; *Pst*I = Ps, *Eco*RI = E; *Pvu*I = PI; *Bgl*II = Bg.



Na de bereiding en opzuivering van het plasmide DNA met Qiagen tips zoals beschreven in 2.9.2., kan het DNA gebruikt worden voor transfectie in niet-producerende myeloma cellen.

Figuur 4.4. : Weergave van de laatste kloneringsstap voor de constructie van de chimere zware keten. De expressiecassette werd met een *HindIII-BamHI* klonering in de PSV-*gpt* vector gebracht.



4.3.2. De constructie van de chimere lichte keten

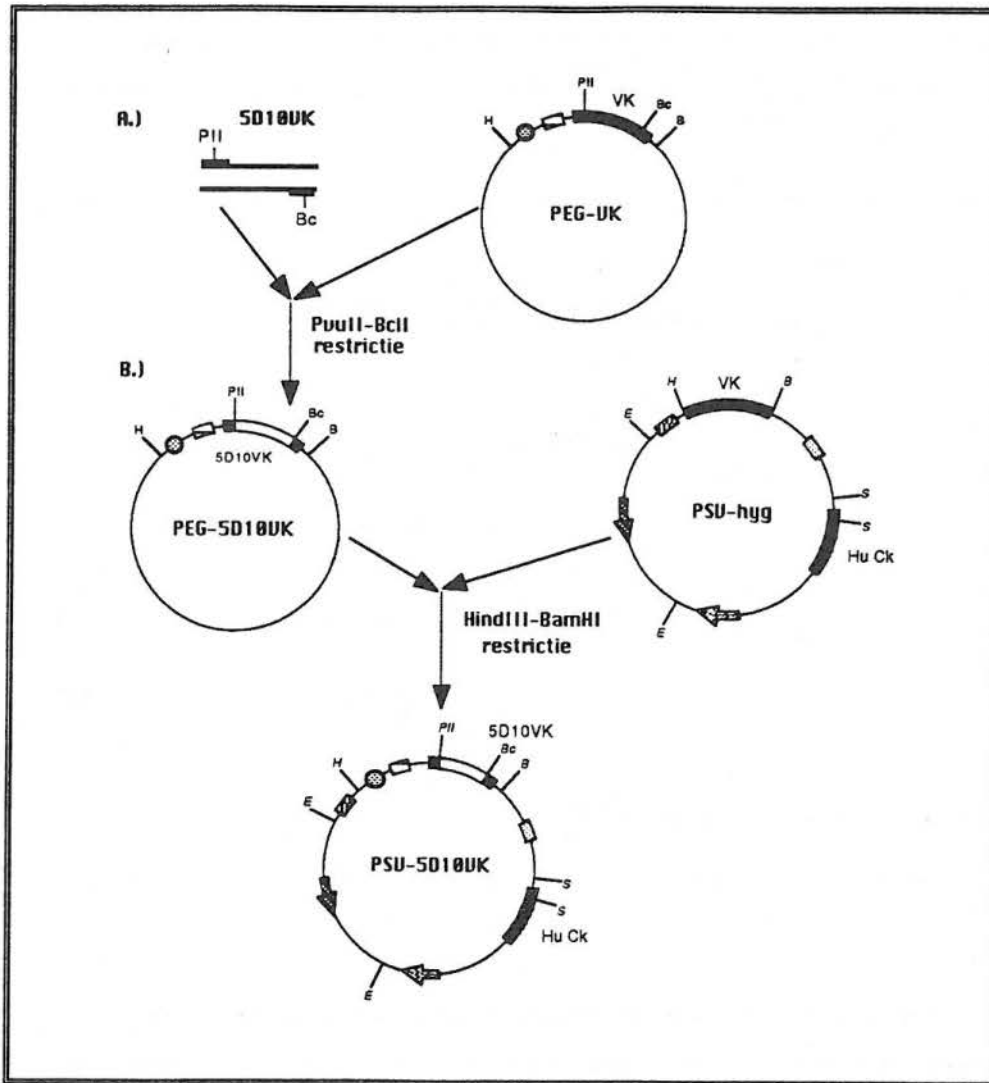
Voor de constructie van de muis/mens chimere lichte keten werd het muis 5D10V_K-gen verbonden aan het humane kappa gen met een niet-coderend gedeelte. Het geamplificeerde 5D10V_K-gen (342 bp) werd in de PEGVK vector geligeerd (3.7., zie figuur 4.5.A).

Figuur 4.5. : Kloneringsschema van het 5D10V_K-gen in de PSV-*hyg* expressievector :

A.) Klonering van het geamplificeerde 5D10V_K-gen in de PEGVK vector na restrictie van fragment en vector met *Bcl*I en *Pvu*II.

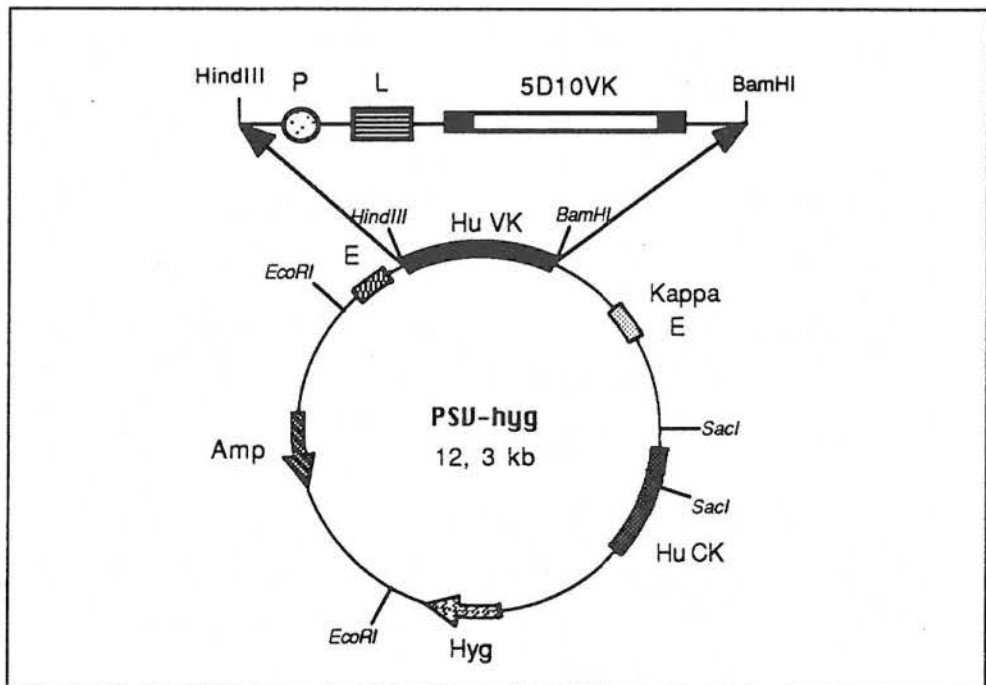
B.) Insertie van het *Hind*III-*Bam*HI fragment uit de PEGVK vector in de PSV-*hyg* vector na het verwijderen van het humane V_K-gen.

De restrictieplaatsen werden afgekort als volgt : *Hind*III = H ; *Bam*HI = B ; *Bcl*I = Bc ; *Pvu*II = PII ; *Sma*I = S ; *Eco*RI = E.



Het *HindIII*-*BamHI* fragment van 646 bp met het gekloneerde 5D10V_K-gen, werd uit de PEGVK vector verwijderd en ingevoegd in de geopende PSV-*hyg* vector (12,3 kb). Het humane V_K-gen (1,9 kb) werd vooraf uit de PSV-*hyg* vector verwijderd door een *HindIII*-*BamHI* restrictie (zie figuur 4.5.B.). Hierbij werden de 3 gebieden aan elkaar gekoppeld nml. de Ig-promotor (P) en signaalpeptidesequentie (L), het muis variabel gebied (5D10V_K) en het humaan constant gebied (C_K). De laatste kloneringsstap werd in detail weergegeven in figuur 4.6..

Figuur 4.6. : Laatste kloneringsstap voor de constructie van de chimere lichte keten waarbij de expressiecassette met een *HindIII*-*BamHI* klonering in de PSV-*hyg* vector werd gebracht.



Na de constructie van de chimeer lichte keten, werd het 5D10V_K-gen gekarakteriseerd en geverifieerd op oriëntatie, zo ook het humane C_K-gen waarvan de aminozuursequentie vergeleken werd met deze beschreven door Kabat e.a. (1987).

Vervolgens werd de PSV-*hyg* vector met de chimere lichte keten getransformeerd in *E.coli* cellen (HB101). Na de bereiding en de opzuivering van het plasmide DNA zoals beschreven in 2.9., kan het DNA gebruikt worden voor transfectie in niet-producerende myelomacellen.

4.4. Bespreking

Het chimeer antilichaam werd geconstrueerd door de variabele gebieden van het 5D10 muis antilichaam met een intron te verbinden aan de constante gebieden van een humaan IgG1 antilichaam.

Voor de constructie van de chimere zware keten werd de expressiecassette (820 bp) bestaande uit de Ig-promotor, signaalpeptide sequentie en het gekloneerde 5D10V_H-gen, uit de M13VHPCR1 vector verwijderd en gekloneerd in de *Hind*III-*Bam*HI geopende PSV-*gpt* vector (7 kb). De oriëntatie van het 5D10V_H-gen werd gecontroleerd met sequentie-analysen. V- en C-genen werden aanééngeschakeld door een niet-coderend gedeelte met de *Bam*HI knipplaats. Het humane C-gamma gen (Honjo e.a., 1979) werd als een *Bam*HI-*Bam*HI fragment in de PSV-*gpt* vector gekloneerd, de *Bam*HI knipplaats aan het 3'-uiteinde van het humane C-gen werd uit de vector verwijderd (T. Bush, MRC, Cambridge, UK). De sequentie die codeert voor humaan C-gamma werd vergeleken met deze beschreven door Ellison e.a. (1982).

De chimere lichte keten werd op dezelfde manier geconstrueerd, namelijk door toevoegen van de expressiecassette met het gekloneerde 5D10V_K-gen (646 bp) in de geopende PSV-*hyg* vector (10,4 kb) die voorzien is van het humane C-kappa gen (Hieter e.a., 1980). Het 5D10V_K-gen werd door een niet-coderend gebied met een *Bam*HI knipplaats aan het humane C-kappa gen gekoppeld. De sequentie van het gekloneerde humaan C_K-gebied werd vergeleken met de beschreven C_K-sequentie volgens Kabat e.a. (1987).

De kloneringsstappen voor de constructie van de chimere genen zijn weergegeven in figuur 4.3. en 4.5. Beide expressievectoren zijn voorzien van een verschillend selectiegen om aparte selectie voor chimere lichte en zware keten mogelijk te maken. Na de opzuivering kunnen de vectoren gebruikt worden voor transfectie en expressie in myelomacellen.

HOOFDSTUK 5 : EXPRESSIE EN KARAKTERISATIE VAN HET MUIS/MENS CHIMEER ANTILICHAAM

5.1. Inleiding

De SP2/0-Ag14 cellijn (Shulmann e.a., 1978) is geschikt voor de expressie van antilichaamgenen. SP2/0 is een hybridoma maar secreteert geen antilichaamketens meer. De cel bezit wel de nodige componenten voor de expressie, glycosylatie en secretie van antilichamen. Na de transfectie van SP2/0 cellen met de antilichaamconstructen kan een stabiele antilichaamproducerende cellijn bekomen worden. De SP2/0 cellijn werd reeds door menig auteur (Morrison e.a., 1984; Bouilanne e.a., 1984; Hoogenboom e.a., 1991) gebruikt voor de expressie van chimere antilichaam genen.

De expressie van antilichamen kan op twee manieren gebeuren :

A.) Door gelijktijdige transfectie van zware en lichte keten genen

B.) Door opéénvolgende transfectie van het lichte en zware keten gen.

Vermits werd aangetoond dat de produktie van alleen de zware keten een toxisch effect heeft op de cellen (Köhler, 1980; Haas en Wabl, 1984) kozen we voor de sequentiële transfectie (methode B) om het 5D10 chimeer antilichaam tot expressie te brengen. De vector met de chimere lichte keten (PSV-5D10VK) wordt eerst getransfecteerd in de SP2/0 cellen. Na selectie met hygromycine wordt vervolgens een goed producerende kloon van de chimere lichte keten getransfecteerd met de chimere zware keten (PSV-5D10VH). Na de selectie voor de produktie van de chimere zware keten, wordt de expressie aangetoond aan de hand van een specifieke ELISA voor de detectie van humane lichte of zware keten en m.b.v. FACS-analysen.

De gebruikte PSV-expressievectoren, PSV-*hyg* en PSV-*gpt*, zijn elk voorzien van een verschillend selectie-gen zodat na expressie apart kan geselecteerd worden voor cellen die de lichte keten (met hygromycine) of zware keten (met mycofenolzuur) produceren.

5.2. Introductie van de expressievector in myelomacellen

De traditionele methode voor het integreren en tot expressie brengen van gekloneerde genen in eukaryote cellen zijn de calciumfosfaat precipitatie, de protoplastfusie of de elektroporatie-techniek. Vermits de elektroporatie-techniek beschreven door Potter e.a. (1984) en Toneguzzo e.a. (1986) een hoge transfectie-efficiëntie verzekert voor alle celtypes (Sahagan e.a., 1986), werd deze techniek gebruikt voor het transfecteren van de gekloneerde genen. De transfectie-frequentie kan nog verhoogd worden door het DNA te lineariseren met restrictieenzymen (Johnson en Phelps, 1988).

5.2.1. Transfectie van de chimere lichte keten

Zoals reeds eerder vermeld, werd geopteerd voor een sequentiële transfectie waarbij eerst de vector met de chimere lichte keten geïntroduceerd wordt in de niet-producerende SP2/0 hybridomacellijn gevolgd door de vector met de chimere zware keten. Ongeveer 10^6 cellen werden onderworpen aan een elektrisch veld bij 150 V en 960 μ F in 800 μ l PBS op 4°C met 5 μ g van de PSV-5D10VK-*hyg* expressievector. De ontladingstijd varieerde bij iedere transfectie tussen de 15 en 35 msec.. Na de transfectie (zie 2.13.) werden de cellen uitverdeeld aan 10 000 cellen/kuiltje in 2 ml RPMI 1640 medium aangevuld met supplementen en FCS (zie 2.12.). De cellen werden geïncubeerd bij 37°C in de CO₂-broedstoof gedurende 48 tot 76 uur. Vervolgens werd het medium verwijderd en vervangen door hygromycine selectief-medium (400 μ g/ml). Na 2 weken waren alle niet-getransfecteerde cellen in het hygromycine selectief medium afgestorven en bleven de resistente cellen stabiel. Het supernatans van volledig volgroeide klonen werd geïsoleerd en getest op productie van de chimere lichte keten met een specifieke ELISA voor de humane kappa keten. De absorbantie-waarden van het chimeer bekomen met ELISA werden vergeleken met de absorbantie-waarden van een LICR standaard. Het percentage "hoge producers" lag op 8 %. Deze klonen werden uitgekozen voor kloneringen d.m.v. eindpuntsdilutie in de afwezigheid van "feeder"cellen maar na toevoeging van kloneringssupplement. Hiervoor werden de cellen uitverdeeld aan 1 tot 3 cellen in een kuilje van 100 μ l en gedurende 10 dagen

geïncubeerd. Na screening voor productie van de chimere lichte keten m.b.v. ELISA voor de humane kappa keten, werden de klonen die de productie van de LICR cellijn benaderden, geïsoleerd en verder opgekweekt. De 0C4IIB5 kloon werd als een goede producer aanzien en gebruikt voor de transfectie met de chimere zware keten.

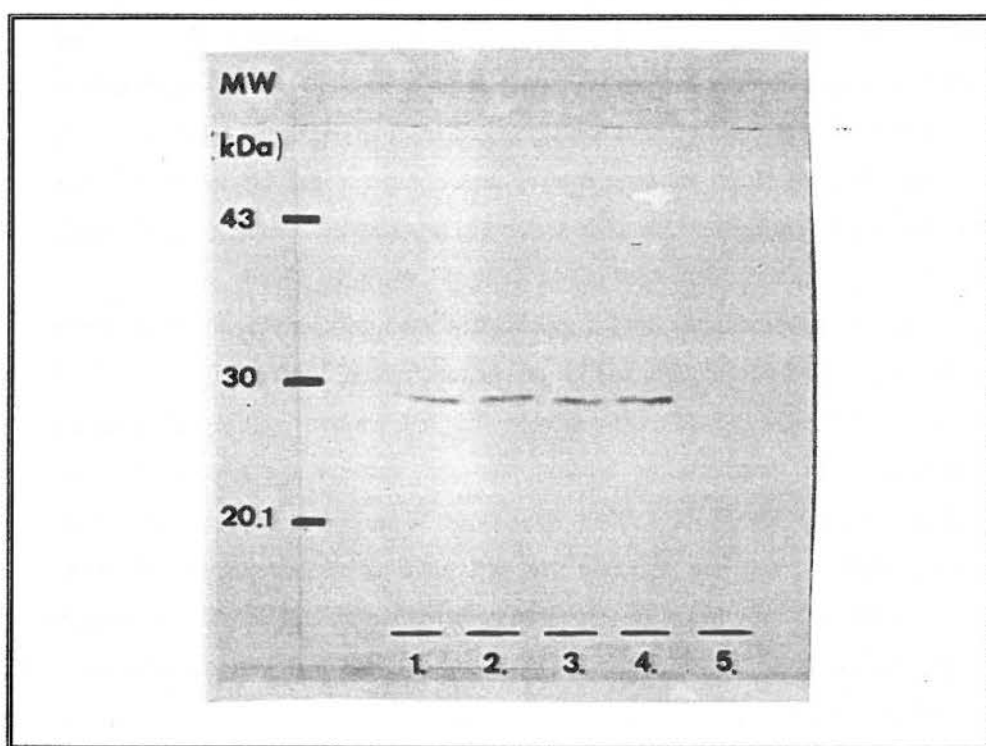
5.2.2. Analyse van de lichte keten transfectoma's

Om de grootte en intactheid van de chimere lichte keten te controleren werd een immunoblot analyse uitgevoerd. Het celkweek supernatans van de 0C4IIB5 kloon bevatte niet genoeg antilichaamfragment voor een rechtstreekse detectie via immunoblot. Vermits men slechts 100 µl vloeistof kan aanbrengen op het elektroforese systeem waarbij men het staal 1/2 moet verdunnen in ladingsbuffer, werd het supernatans geconcentreerd in een Amicon-centriprep 30 buis. Hierbij moet men er rekening mee houden dat de cellijn werd opgegroeid in medium met toegevoegd FCS (10%) waardoor de hoge eiwitconcentratie moeilijkheden gaf bij de SDS-PAGE. Vervolgens werd de cellijn gekweekt in serum vrij medium gedurende 3 dagen waarna het supernatans geconcentreerd werd in een Amicon-Centriprep 30 buis.

De secretie-produkten werden gescheiden onder reducerende omstandigheden op een 10 % SDS-PAGE (zie 2.15.) en getransfereerd naar een nitrocellulose membraan m.b.v. elektro"blot". De detectie van het chimeer antilichaam-fragment gebeurde door het membraan te kleuren met geit anti-humaan kappa peroxidase conjugaat (zie 2.16). De 0C4IIB5 cellijn secreteerde de verwachte lichte keten waarvan de lengte werd bepaald aan de hand van een moleculaire gewichtsmerker en het supernatans van de LICR cellijn. Het moleculair gewicht van de lichte keten evenaarde deze van LICR en bedroeg ongeveer 27 kDa. Het resultaat van de kleuring is weergegeven in figuur 5.1..

De cellen van de 0C4IIB5 kloon die overbleven na de selectie met hygromycine werden geanalyseerd naar het bezit van het 5D10V_K-gen aan de hand van een PCR-reaktie. Hiervoor werden 5000 cellen gewassen met PBS en in suspensie gebracht in 100 µl water.

Figuur 5.1. : Immunoblot analyse van de chimere lichte keten. De geconcentreerde supernatantia werden gescheiden onder reducerende omstandigheden op een 10% SDS-PAGE en vervolgens getransferreerd naar een nitrocellulose membraan (2 µm). De detectie van de lichte keten gebeurde door een immunologische kleuring met het geit anti-humaan kappa peroxidase conjugaat. De LICR cellijn (staal 3 en 4) produceert een humaan antilichaam (positieve controle) met een lichte keten van ongeveer 27 kDa, de OC4IIB5 cellijn (staal 1 en 2) produceert de chimere lichte keten van ongeveer 27 kDa en de SP2/0 cellijn (staal 5) is een niet-producerende cellijn (negatieve controle). De moleculaire gewichtsmerker werd aangeduid.



De cellen werden 10 minuten gekookt in een waterbad en na centrifugatie (10 seconden aan 13 000 rpm) heropgelost in water, 50 pmol van elk primer oligonucleotide, 5D10VKFOR en 5D10VKBACK, werd toegevoegd aan het staal en de PCR-

reactie werd uitgevoerd zoals beschreven in 2.4.. Het geamplificeerde fragment werd gescheiden op een 1% agarose/1,8 % LMP gel en met ethidiumbromide zichtbaar gemaakt onder U.V. licht (resultaat niet weergegeven). De lengte van het geamplificeerde fragment, 342 bp kwam overeen met de lengte van het getransfecteerde 5D10V_K-gen zodat we konden besluiten dat de cellen van de 0C4IIB5 kloon na de selectie met hygromycine positief waren voor het 5D10V_K-gen. De productie van verschillende klonen werd gedurende een aantal weken gevolgd (4 tot 8 weken) om zekerheid te hebben omtrent de stabiliteit.

5.2.3. Transfectie van de chimere zware keten

Om een intact chimeer antilichaam te bekomen werden 10⁶ cellen van de 0C4IIB5 kloon, positief voor het chimere gen van de lichte keten (PSV-5D10VK vector), getransfecteerd met 4 µg opgezuiverd DNA van de PSV-5D10VH vector, de vector die de chimere genen van de zware keten bevat en tot expressie kan brengen. De transfectie van het DNA werd uitgevoerd met de elektroporatie-techniek (Potter e.a., 1984) bij 150 V en 960 µF (zie 2.13). De overlevende cellen werden uitverdeeld aan 10 000 cellen/kuiltje van 2 ml en geïncubeerd in een CO₂-broedstof bij 37°C gedurende 48 tot 72 uur.

Het geïntroduceerde DNA bevat het *E.coli gpt*-gen zodat de getransfecteerde cellen geselecteerd kunnen worden op basis van de chimere zware keten door aan het medium mycofenolzuur, xanthine en hypoxanthine toe te voegen (Morrison e.a., 1985). De mycofenolzuur-concentratie werd bepaald aan de hand van een verdunningsreeks waarbij myelomacellen (SP2/0) gedurende 1 week werden geïncubeerd in medium met verschillende concentraties mycofenolzuur, de ideale eindconcentratie bedroeg 1 µg/ml. De eindconcentraties van xanthine en hypoxanthine werden achterhaald uit artikels (Sahagan e.a., 1986; Hoogenboom e.a. 1990), voor xanthine bedroeg dit 250 µg/ml en voor hypoxanthine bedroeg dit 15 µg/ml. Om de oplosbaarheid van de selecterende stoffen te verhogen, werden ze opgelost in NaOH (1N) waarna de pH van het medium werd aangepast met HCl (1N) tot een pH van 7.4.

De klonen die overbleven na selectie werden verder opgekweekt maar bleken niet stabiel te zijn; ze stierven geleidelijk aan af. Daar efficiëntie van de transfectie

afhankelijk van de zuiverheid van het DNA maar ook van de plaats waar het gen zich invoegt in het genoom werd een tweede transfectie-experiment uitgevoerd met een gelineariseerde vector. De PSV-5D10VH vector werd gelineariseerd met het *PvuI* of het *BamHI* enzyme en opgezuiverd met de "Prep-A-Gene" DNA opzuiveringskit. De *PvuI* knipplaats ligt in een niet-coderend gebied van de PSV-*gpt* vector en is verwijderd van de chimere genen, de *BamHI* knipplaats ligt eveneens in een niet-coderend gebied maar ligt tussen het V- en C-gen. De cellen van de 0C4IIB5 kloon werden getransfecteerd met de geknipte vector met behulp van elektroporatie bij 160 V en 960 μ F. De incubatie en selectie van de getransfecteerde cellen gebeurde op dezelfde manier als reeds beschreven.

De klonen werden aan de hand van specifieke ELISA's voor de humane kappa en gamma keten (zie 2.14) regelmatig gecontroleerd naar productie van het chimeer antilichaam. De absorbantie-waarden van de klonen bekomen met ELISA werden vergeleken met een LICR standaard. Het percentage "hoge producers" lag op 20 % voor de klonen getransfecteerd met *PvuI* gelineariseerd DNA. Voor de klonen getransfecteerd met *BamHI* gelineariseerd DNA lag het percentage op 26 % en viel na verloop van tijd terug naar 8 %. De oorzaak van deze instabiliteit ligt heel waarschijnlijk aan de restrictie van de vector met het enzyme *BamHI* zodat het V- en C-gen van elkaar worden gescheiden waardoor de expressie van het chimeer antilichaam verstoord wordt.

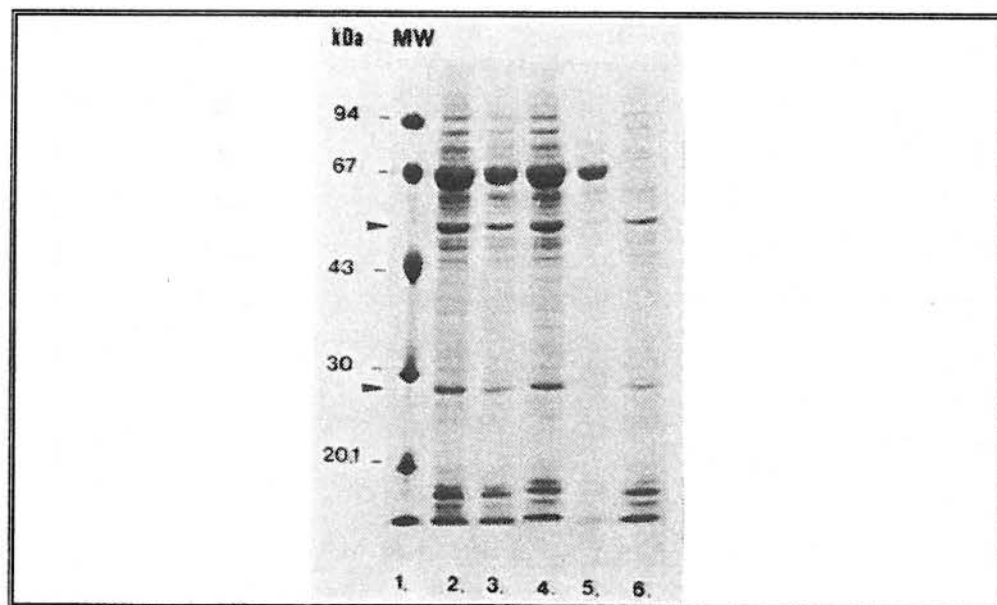
Enkele "hoge producers" (P1B3, P1B5, B1B2, B1B4) werden gekloneerd d.m.v. eindpuntdilutie in aanwezigheid van klonerings-supplement (GibcoBRL, Gaithersburg, VS) aan een 1/10 verdunning. Na een incubatie van de cellen gedurende 48 tot 72 uur in een CO₂-broedstoof bij 37°C, werd het medium verwijderd en vervangen door selectief medium. De klonen werden gedurende 14 dagen opgegroeid en regelmatig getest op productie aan de hand van specifieke ELISA's voor de humane kappa en gamma keten (zie 2.13). Vervolgens werden de "hoge producers" geanalyseerd met SDS-PAGE, "elektroblot" en FACS-analysen.

5.3. Analyse van de expressieproducten

5.3.1. Eiwit-elektroforese en immunoblot van geconcentreerd serumvrij SN

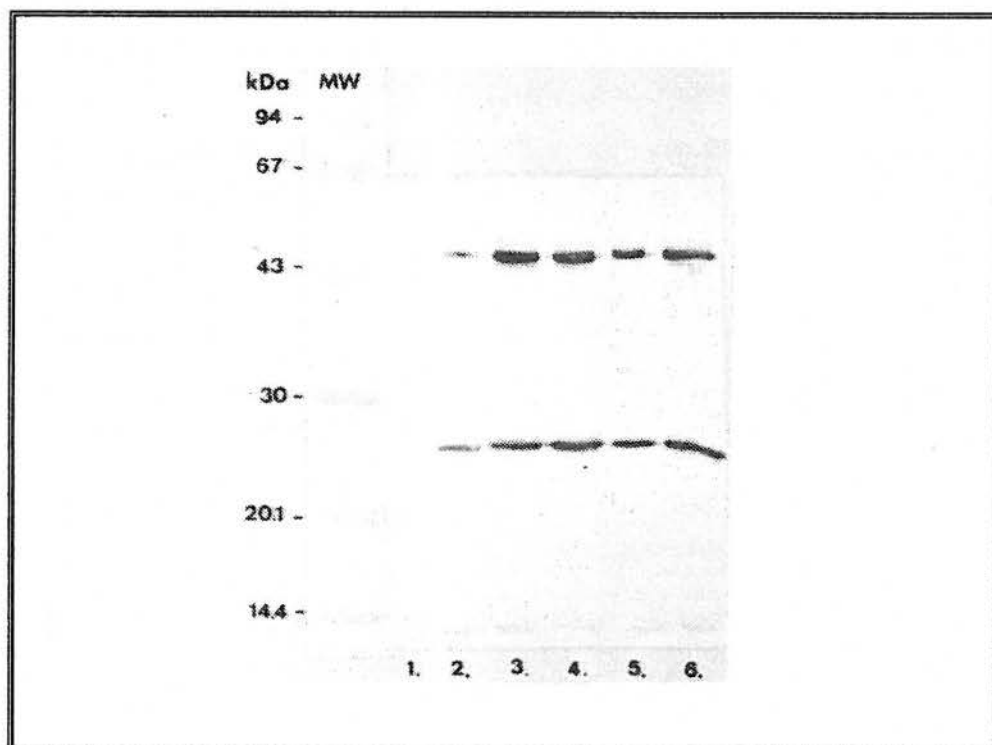
De grootte en intaktheid van de chimere lichte en zware keten werden in de eerste plaats bepaald aan de hand van SDS-PAGE en immunoblot analyses. Om dezelfde reden als voordien (5.2.2.) werden de klonen gedurende 3 dagen gekweekt in serum-vrij medium en werd het supernatans geconcentreerd met een Centriprep-30 buis. De secretieproducten werden onder reducerende omstandigheden gescheiden op een 10 % SDS-PAGE volgens hun moleculair gewicht (zie 2.15). Verschillende klonen van P3B4 : C3, C4, C5 en C6 bevatten na de scheiding hoge concentraties secretieproducten zoals weergegeven in figuur 5.2..

Figuur 5.2. : Scheiding van de geconcentreerde secretieproducten onder reducerende omstandigheden op een 10 % PAA gel. De moleculaire gewichtsmarker (MW) is weergegeven in laan 1. Laan 2 is de scheiding van het supernatans (SN) van de P3B4C3 cellijn. Laan 3 is SN van de P3B4C4 cellijn, laan 4 is SN van de P3B4C6 en laan 5 en 6 is SN van de P3B4D4 cellijn.



Vermits de scheiding van de secretieproducten voor alle klonen eenzelfde patroon gaf en er weinig verschillen waren tussen de klonen onderling, werd een willekeurige kloon C3 uitgepikt en gebruikt voor immunoblot- en bindingsanalysen. Om de klonaliteit van de C3 kloon te verzekeren werd bij voor een tweede maal uitgeklooneerd d.m.v. eindpuntdilutie. Na analyse op productie m.b.v. specifieke ELISA's voor de humane kappa en gamma-1 keten, bleken de supernatantia van de gekloneerde cellen allemaal positief te zijn wat zeer suggestief is voor de klonaliteit van de cellijn.

Figuur 5.3. : Immunoblot analyse van geconcentreerde supernatantia. De stalen werden onder reducerende omstandigheden gescheiden op een 10 % SDS-PAA gel en getransferreerd naar een nitrocellulose membraan. De kleuring werd uitgevoerd met het anti-humaan kappa peroxidase conjugaat en het anti-humaan IgG1 biotine conjugaat. De moleculaire gewichtsmerker (MW) is weergegeven. SP2/0 (1) is een "non" producer, LICR (2) secreteert een humaan antilichaam, 1D8 (3), 1C8 (4-5) en P3B4C3 (6) secreteren beide chimere ketens.



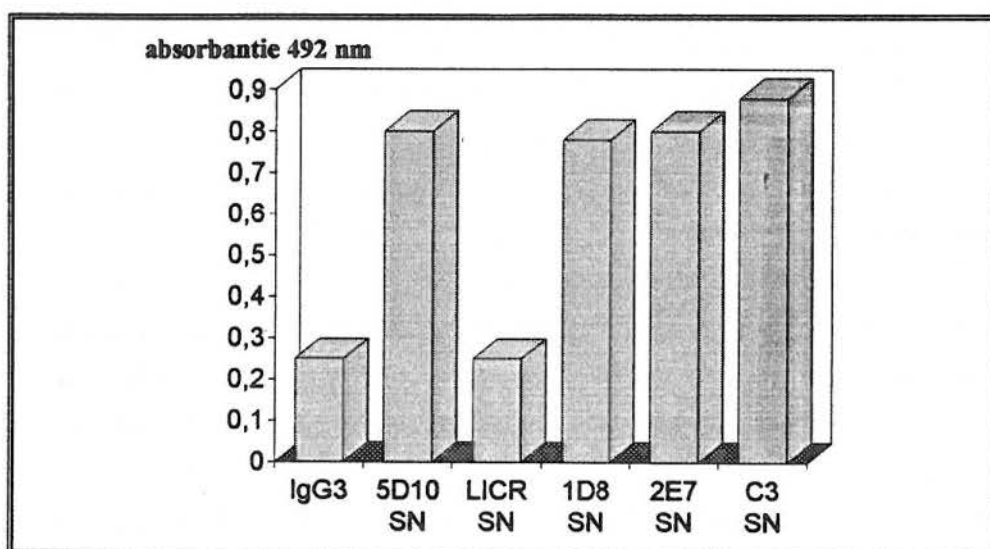
Enkele "hoge producers" (1D8, 1C8) werden na SDS-PAGE getransferreerd naar een nitrocellulose membraan m.b.v. "elektroblot". De detectie van de ketens op het membraan gebeurde met het geit-anti-humaan kappa peroxidase conjugaat voor de lichte keten, en met het anti-humaan IgG1 biotine conjugaat voor de zware keten (zie 2.16.). Na de kleuring van het membraan werden de chimere lichte en zware keten zichtbaar. Het moleculair gewicht van de ketens werd bepaald aan de hand van een moleculaire gewichtsmarker en een positieve controle (LICR) waarvan de lengte van de ketens gekend zijn. De cellijnen secreteerden de verwachte eiwitten : een zware keten van 55 kDa en een lichte keten van 27 kDa. Figuur 5.3. toont een immunoblot analyse van geconcentreerd supernatans van verschillende cellijnen.

5.3.2. Antigeenbindingsstudies

De secretieprodukten van de cellijnen werden aan de hand van een specifieke ELISA getest voor binding aan de MCF-7 borstkankercellen (zie 2.11.). Voor deze test werden de MCF-7 cellen gekweekt in een 100 μ l kuiltje aan 10^5 cellen/kuiltje gedurende 24 uur in een CO₂-broedstoof bij 37°C. Vervolgens werden de cellen gefixeerd met glutaraaldehyde en nabehandeld zoals beschreven in 2.14.3.. Na het "overcoaten" van de cultuurplaat met 2% FCS werd het supernatans van de klonen aan de cellen toegevoegd. De detectie van de binding gebeurde met anti-humaan IgG gebiotinylerde conjugaten voor het chimeer antilichaam, terwijl de detectie van de binding van het oorspronkelijke 5D10 muis antilichaam en andere muis antilichamen gebeurde met affiniteits-gezuiverd geit anti-muis peroxidase conjugaat. In figuur 5.4. werden de bekomen absorptie-waarden uitgezet in een diagram.

De secretieprodukten van de klonen die het chimeer antilichaam produceren (1D8 SN, 2E7 SN, 1C8 SN) binden in gelijke mate aan de MCF-7 cellen als het supernatans van de 5D10 hybridomacellijn. Daarmee is bewezen dat de lichte en zware keten functioneel zijn opgevouwen tot een antigeen-herkennend antilichaam.

Figuur 5.4. : Bindingstest van supernatantia (SN) van verschillende cellijnen aan de MCF-7 borstkankercellen m.b.v. ELISA. De absorbantie-waarden van de verschillende klonen die het chimeer antilichaam produceren, 1D8, 2E7, C3 werden weergegeven naast de absorbantie-waarden van het 5D10 muis antilichaam en de negatieve controles : een irrelevant muis IgG3 antilichaam en supernatans (SN) van de humane LICR cellijn.



5.4. Bespreking

De chimere genen van lichte en zware keten werden door opeenvolgende transfecties in de niet-producerende SP2/0 cellijn gebracht. De transfecties werden uitgevoerd met de elektroporatie-techniek (Potter e.a., 1984). De transfectie van de chimere lichte keten leverde ons, na selectie van de cellen met hygromycine, 8 % hoge producers. Een goede producer (0C4IIB5) werd gebruikt voor de transfectie van de chimere genen van de zware keten. Het DNA werd alleen door de cellen opgenomen wanneer het vóór transfectie gelineariseerd werd met restrictie-enzymes. Restrictie van de vector met het *PvuI* enzyme leverde na transfectie verschillende stabiele klonen, terwijl de produktie van de klonen, getransfecteerd met de *BamHI* geknipte vector,

daalde. Het knippen van de vector met het *Bam*HI enzyme zou de expressie van de chimere genen kunnen verstoren.

Na het uitklonen van de getransfecteerde cellen werd het supernatans van een aantal goed producerende cellijnen geanalyseerd. Na immunoblot analyses werden de chimere lichte (27 kDa) en zware keten (55 kDa) zichtbaar wat wijst op de secretie van een intact chimeer antilichaam. Enkele klonen werden geëvalueerd met een bindingstest aan MCF-7 cellen in een specifieke ELISA. 1D8, 1C8, 2E7,... gaven hier een positief resultaat zoals weergegeven in figuur 5.4.

Uit voorgaande resultaten kan worden besloten dat de transfectie en de isolatie van secreterende klonen met goed gevolg werd uitgevoerd. De efficiëntie van de transfectie verhoogde na het lineariseren van het DNA zoals voordien reeds werd aangetoond door Johnson en Phelps (1988). Het chimeer antilichaam voldoet aan de verwachte eigenschappen qua grootte van de antilichaamketens en antigeenbinding. Uit de analyse-testen blijkt dat de secretieprodukten steeds geconcentreerd moesten worden een voldoende hoeveelheid te bekomen, dit geeft weer dat het chimeer antilichaam waarschijnlijk in lage concentratie wordt gesecreteerd.

Om de effectieve productie van de cellijnen na te gaan, werden de secretieprodukten gezuiverd over een proteïne A-sepharose kolom en werd de concentratie van het antilichaam bepaald aan de hand van absorbantie-metingen.

HOOFDSTUK 6 : OPZUIVERING EN SPECIFICITEIT VAN HET CHIMEER ANTILICHAAM

6.1 Inleiding

Het positief resultaat in ELISA duidt erop dat de chimere genen zodanig werden geconstrueerd dat expressie en secretie van het chimeer antilichaam mogelijk werd. Om een intact en zuiver chimeer antilichaam te bekomen werd het supernatans van de desbetreffende kloon opgezuiverd. Hiervoor werd de 1D8 kloon opgegroeid in cultuurflessen en na het oogsten van het supernatans werd het chimeer antilichaam gezuiverd m.b.v. affiniteitschromatografie.

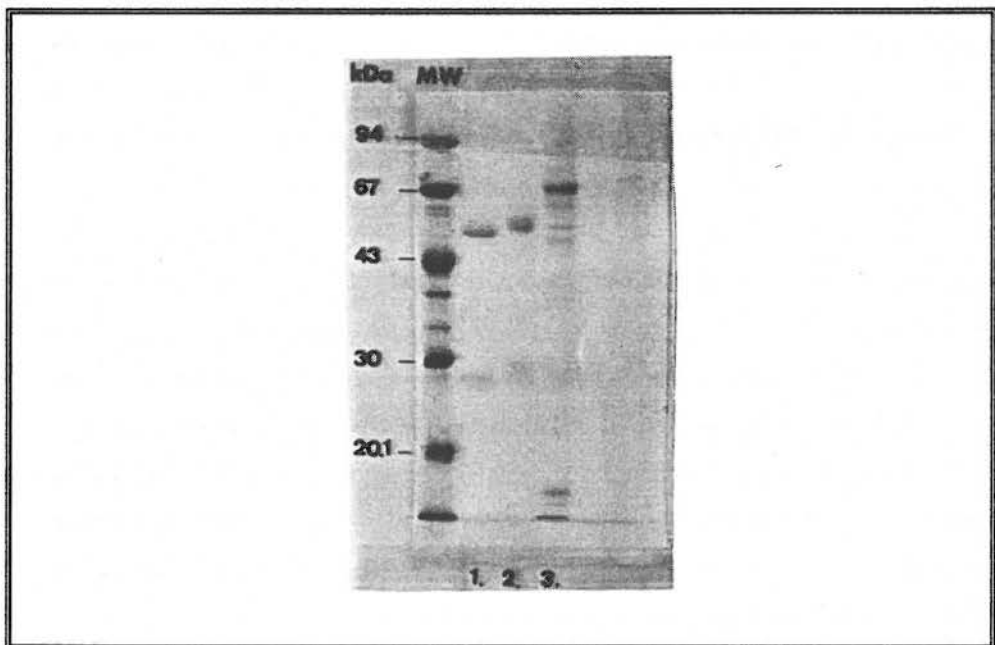
6.2. De opzuivering van het chimeer antilichaam

Staphylococcus proteïne A is gekend voor zijn bindingscapaciteit aan immunoglobulinen van verschillende species en werd dan ook gebruikt voor de opzuivering van IgG antilichamen (Ey e.a., 1978). De gesecreteerde immunoglobulinen van de 1D8 cellijn werden opgezuiverd d.m.v. proteïne A-Sepharose chromatografie (zie 2.18.). Hiervoor werd de laatste kweekstap uitgevoerd in serumvrij medium. Vervolgens werd het supernatans ($\approx 1,5$ l) gedialyseerd en, vermits er maar een kleine hoeveelheid op de kolom kon aangebracht worden, werd het supernatans geconcentreerd. Vóór de zuivering van het supernatans werd het staal 1/2 verdund in bindingsbuffer (pH 9) en werd het vervolgens aangebracht op de proteïne A-Sepharose kolom. De kolom werd gewassen en het gebonden eiwit werd van de kolom geëluëerd met elutiebuffer (pH 3). De fracties die het eiwit bevatten werden samengevoegd en gedialyseerd t.o.v. PBS (pH 7-8). De opbrengst aan eiwit van de 1D8 cellijn bedroeg ongeveer 330 ng/ ml/ 10^6 cellen/ 48 uur.

6.3. Karakterisatie van het opgezuiverde produkt

6.3.1. Eiwit-elektroforese en immunoblot analyses

Na de zuivering werd de intactheid van het chimeer antilichaam aangetoond met SDS-PAGE onder reducerende omstandigheden. 10 μ g van elk staal, chimeer 1D8 en muis 5D10 antilichaam, werd geladen op een 10 % SDS-PAGE. Na de elektroforese uitgevoerd volgens de methode beschreven in 2.15., werd het eiwitgel gekleurd met een Coomassie-blauw oplossing (zie 2.15.).



Figuur 6.1. : SDS-PAGE van het oorspronkelijke 5D10 muis antilichaam (1) en het opgezuiverde 1D8 chimeer antilichaam (2) onder reducerende omstandigheden. Het moleculair gewicht van lichte (27 kDa) en zware keten (55 kDa) werden bepaald aan de hand van een moleculaire gewichtsmerker (MW). Laan 3 geeft een scheiding weer van het onopgezuiverde 1D8 chimeer antilichaam.

Het moleculair gewicht van de chimere lichte en zware keten werd bepaald aan de hand van een moleculaire gewichtsmarker en bedroeg ongeveer 27 kDa voor de chimere lichte keten en 55 kDa voor de chimere zware keten. De mobiliteit van het chimeer antilichaam is gewijzigd t.o.v. het oorspronkelijke muis antilichaam vermits de muis C-delen vervangen werden door C-delen van een humaan antilichaam (zie figuur 6.1.).

Als controle werd een tweede gel gebruikt voor immunoblot analyse (zie 2.16.). De eiwitten werden getransferreerd op een nitrocellulose membraan waarna het membraan gekleurd werd met het gebiotinylerde geit anti-humaan IgG conjugaat om de chimere zware keten te detecteren, en het geit anti-humaan kappa peroxidase conjugaat om de chimere lichte keten te detecteren. Beide ketens werden zichtbaar. Het moleculair gewicht van de ketens werd bepaald aan de hand van een moleculaire gewichtsmarker die na immunoblot analyse tijdelijk werd gekleurd met Ponceau S (zie 2.16.).

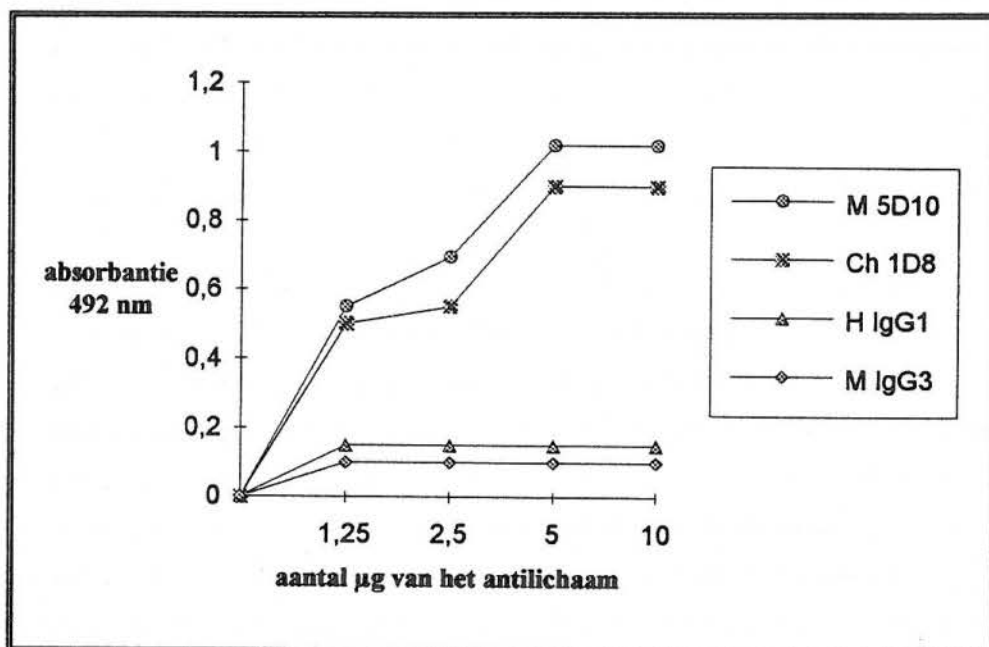
6.3.2. Specificiteit van het chimeer antilichaam

Na de opzuivering zou het chimeer antilichaam in dezelfde mate moeten binden aan de MCF-7 borstkankercellen als voorheen. Daarom werd in eerste instantie de specificiteit van het chimeer antilichaam aangetoond m.b.v. een specifieke ELISA. Hiervoor werden MCF-7 borstkankercellen gedurende 24 uur gekweekt in een steriele microtiterplaat aan een concentratie van 10^5 cellen/100 μ l /kuiltje. De cellen werden gefixeerd en nabehandeld zoals beschreven in 2.14.3..

Vervolgens werd de binding van het chimeer antilichaam aan de MCF-7 cellen bepaald aan de hand van een verdunningsreeks. De bekomen absorbantie-waarden werden uitgezet in een diagram zoals weergegeven in figuur 6.2. Hierbij fungeerde het 5D10 muis antilichaam als positieve controle en het humaan IgG1 en muis IgG3 antilichaam als negatieve controle. De gebruikte negatieve controles zijn opgezuiverde antilichamen die werden aangekocht bij firma's (zie 2.14.). Voor deze test werd het 5D10 antilichaam op dezelfde wijze opgezuiverd als het 1D8 chimeer antilichaam om vergelijkbare resultaten te bekomen.

De stalen werden uitgezet in een verdunningsreeks : 0 μg ; 1,25 μg ; 2,5 μg ; 5 μg ; 10 μg / 100 μl en de binding werd gedetecteerd met een anti-humaan biotine conjugaat voor chimeer en humaan antilichaam; en met een anti-muis peroxidase conjugaat voor de gebruikte muizenantilichamen.

Figuur 6.2. : Bindingstest van het opgezuiverde chimeer antilichaam (Ch 1D8) aan de MCF-7 borstkankercellen met behulp van een specifieke ELISA. Het 5D10 muis antilichaam (M 5D10) fungeerde als positieve controle en het humaan IgG1 (H IgG1) en muis IgG3 antilichaam (M IgG3) als negatieve controle. De detectie gebeurde met het gebiotinylerde anti-humaan IgG conjugaat, voor het chimeer 1D8 en het humaan IgG1 antilichaam, en met het geit anti-muis peroxidase conjugaat voor de muis antilichamen.



De bindingsspecificiteit van het 1D8 chimeer antilichaam aan de MCF-7 borstkankercellen is van dezelfde grootte orde als het oorspronkelijke muis antilichaam terwijl het humaan IgG1 en muis IgG3 antilichaam geen binding vertoonden.

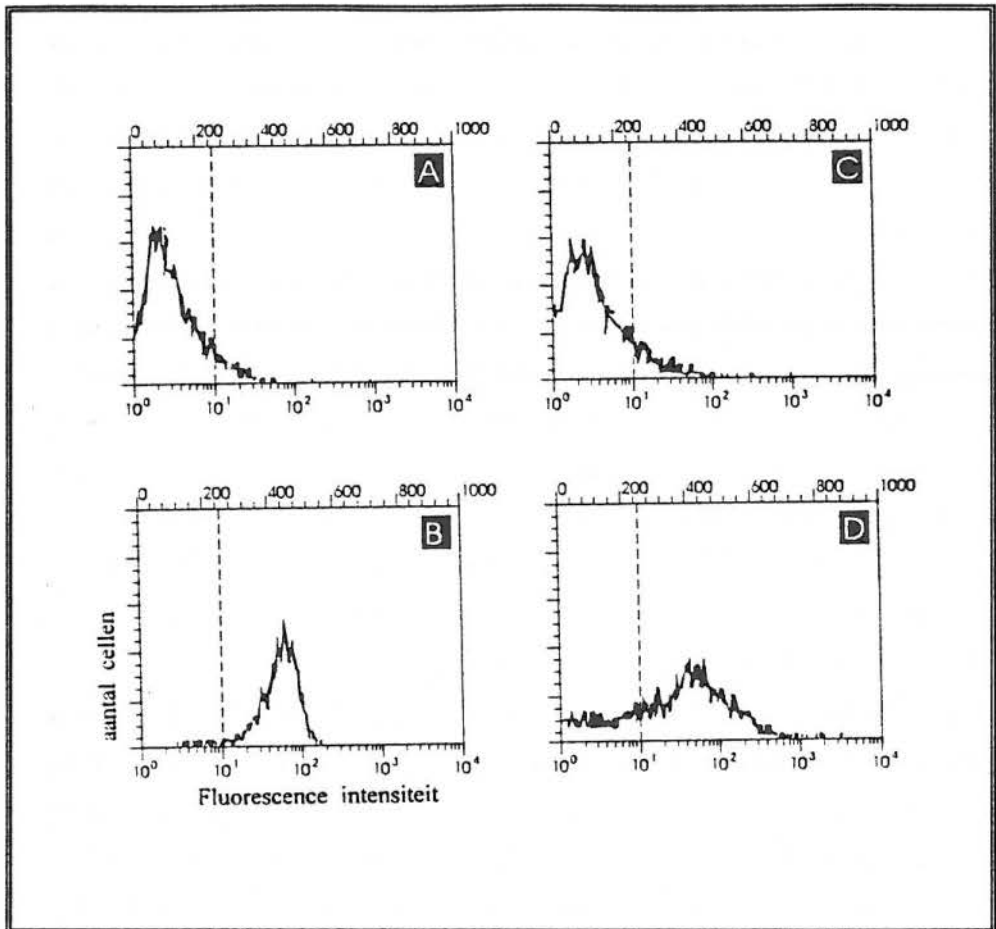
Met deze ELISA-test werd aangetoond dat het opgezuiverd chimeer antilichaam de MCF-7 borstkankercellen herkent en daarmee is ook bewezen dat de zware en lichte keten functioneel zijn opgevouwen tot een antigeen-herkennend antilichaam.

De binding van het chimeer antilichaam aan de borstkankercellen werd in tweede instantie nagegaan met FACS-analysen (zie 2.17). Hierbij wordt de binding van de antilichamen aan de kankercellen gedetecteerd met fluorescerende antilichamen. De verdeling van de fluorescentie-intensiteit t.o.v. de celpopulatie wordt dan uitgezet in een FACS-diagram.

Twee kleuringsmethoden werden uitgetest, de PE- en FITC-kleuring (zie 2.17), de PE-kleuring gaf de beste resultaten voor FACS-analyse en werd gebruikt voor verdere bepalingen. Hierbij werden 5×10^5 MCF-7 cellen geïncubeerd met 100 μ l staal. Het 5D10 antilichaam diende als positieve controle, een niet-specifiek muis IgG3 antilichaam en humaan IgG1 antilichaam als negatieve controle. Kleuring van de cellen met het muis 5D10 antilichaam en het chimeer 1D8 antilichaam gaf hetzelfde patroon in het FACS-diagram zoals weergegeven in figuur 6.3. wat de binding van het chimeer antilichaam aantoont. Een niet-specifiek humaan IgG1 en muis IgG3 antilichaam bonden zoals verwacht niet aan de MCF-7 borstkankercellen.

De bindingsefficiëntie van het chimeer antilichaam werd bepaald aan de hand van een verdunningsreeks. Voor het 1D8 chimeer antilichaam bekwamen we in FACS-analyse vanaf 2 μ g een positief resultaat. De detectie-grens voor het 5D10 muis antilichaam lag iets gevoeliger, het humaan IgG1 en muis IgG3 antilichaam gaven voor geen enkele concentratie-waarde binding (resultaat niet weergegeven). Met deze test werd eveneens aangetoond dat de bindings-capaciteit van het chimeer antilichaam werd behouden.

Figuur 6.3. : Bepaling van de bindingscapaciteit van het chimeer 1D8 antilichaam (D) t.o.v. het 5D10 muis antilichaam (B) aan de MCF-7 borstkankercellen m.b.v. FACS-analyse. Een muis IgG3 (A) en een humaan IgG1 antilichaam (C) werden als negatieve controle gebruikt.



6.4. Biologische aktiviteit van het chimeer antilichaam

Vermits de binding van het chimeer antilichaam aan de MCF-7 kankercellen werd aangetoond in ELISA-testen en FACS-analysen, werd nagegaan of het chimeer antilichaam cytotoxisch was voor de borstkankercellen. De biologische aktiviteit van

het chimeer antilichaam werd uitgetest op de MCF-7 borstkankercellijn en de Daudi-celijn in een standaard "chromium release" test van 4 uur. Het radioactief merken van de target cellen (MCF-7 of Daudi cellen) met $^{51}\text{Chroom}$ en het isoleren van de mononucleaire effector cellen (PBLs) uit humaan bloed werd beschreven in 2.19. De radioactief gemerkte target cellen (MCF-7 of Daudi cellen) werden uitverdeeld in een microtiterplaat aan 5×10^3 cellen/100 μl /kuiltje samen met de effector cellen (PBLs) (50 μl /kuiltje), aan verschillende effector/target verhoudingen (E:T = 10:1, 50:1 of 100:1), en het antilichaam (50 μl /kuiltje), aan verschillende concentraties. De stalen werden steeds in duplikaat ingezet. Hierop werd de microtiterplaat gedurende 4 uur geïncubeerd in een CO_2 -broedstoof bij 37°C . De maximale vrijzetting werd bekomen door de targetcellen te lyseren met H_2SO_4 (4M), de spontane vrijzetting werd bepaald door de targetcellen te incuberen in medium. Het percentage specifieke vrijzetting werd berekend als volgt :

$$\% \text{ specifieke lyse} = \frac{\text{vrijzetting in de test} - \text{spontane vrijzetting}}{\text{maximale vrijzetting} - \text{spontane vrijzetting}} \times 100$$

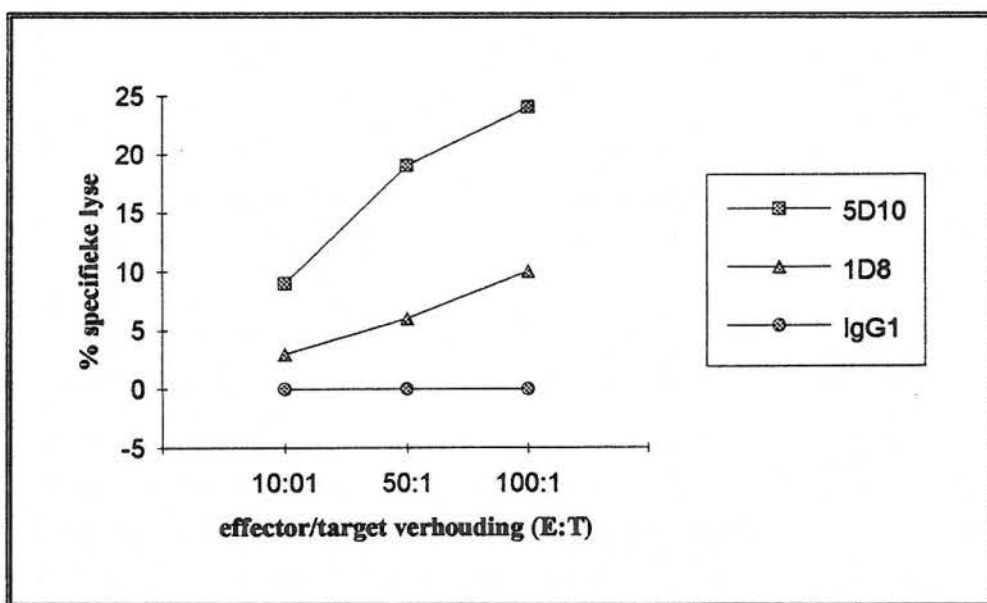
Met deze test werd het lytisch effect van het antilichaam (het 5D10 monoclonaal, het 1D8 chimeer of een irrelevant humaan IgG1 antilichaam (Sigma, St. Louis, MO)) op de target cellen (MCF-7 of Daudi cellen) bepaald in de aanwezigheid van humane effectorcellen (PBLs).

A.) De invloed van de target/effector verhouding op antilichaam afhankelijke cytotoxiciteit (ADCC) werd nagegaan bij éénzelfde concentratie antilichaam (10 $\mu\text{g/ml}$). Hiervoor werd het percentage specifieke lyse op de targetcellen (MCF-7 of Daudi cellen) bepaald voor het 5D10 monoclonaal, het 1D8 chimeer en een irrelevant humaan IgG1 antilichaam bij verschillende effector/target verhoudingen (E:T = 10:1, 50:1 en 100:1). Het rechtstreeks effect van de effector cellen (PBLs) op de target cellen werd bepaald door een incubatie van target cellen met effector cellen in afwezigheid van antilichaam.

Hierbij werd een lyse van 2,5 % (voor E:T = 10 :1), 3,5 % (voor E:T = 50:1) en 4 % (voor E:T = 100:1) vastgesteld.

In figuur 6.4. werden de waarden van specifieke lyse op de MCF-7 cellen uitgezet voor de verschillende antilichamen (het 5D10 monoclonaal, het 1D8 chimeer en het IgG1 irrelevant humaan antilichaam), elk aan 10 µg/ml, bij een effector/target verhouding van 10:1, 50:1 en 100:1). De waarden werden gecorrigeerd van het rechtstreeks effect van de effector cellen (PBLs) op de target cellen. Bij een effector/target verhouding van 100:1 werd een significant ADCC waargenomen, 24 % specifieke lyse voor het 5D10 antilichaam en 10 % voor het 1D8 chimeer antilichaam. Het 1D8 chimeer antilichaam vertoont duidelijk een daling in ADCC t.o.v. het oorspronkelijke 5D10 muis antilichaam (10 % t.o.v. 24 %).

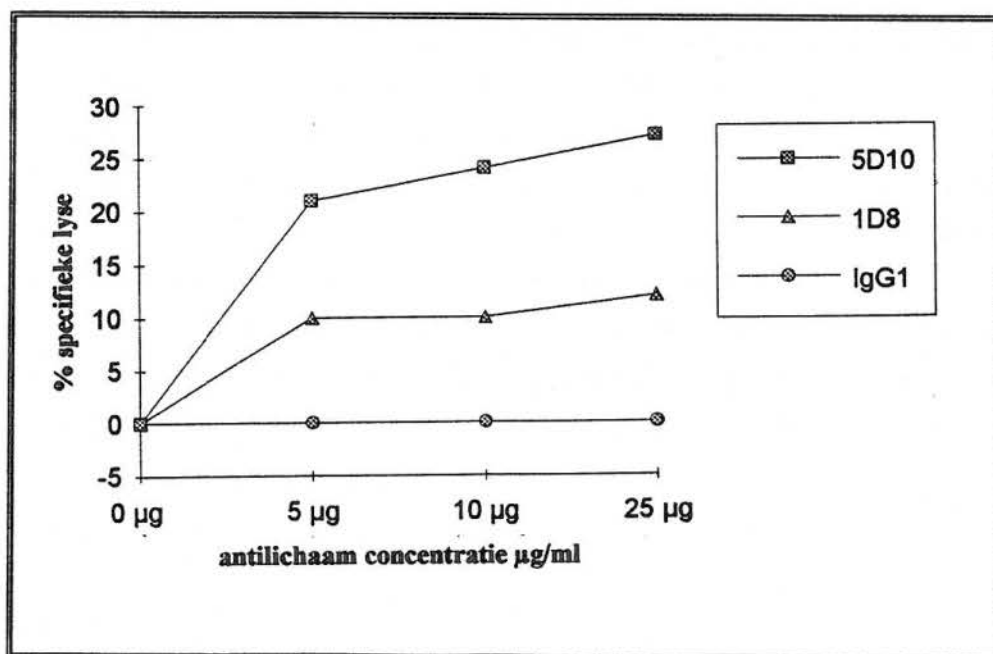
Figuur 6.4. : De biologische aktiviteit van het 5D10 muis, 1D8 chimeer en IgG1 humaan antilichaam (10 µg/ 100 µl). Het percentage (%) specifieke lyse van de MCF-7 cellen veroorzaakt door de verschillende antilichamen werd uitgezet voor verschillende effector/target (E/T) verhoudingen (10:1, 50:1 en 100:1).



Om aan te tonen dat het bekomen cytotoxisch effect (figuur 6.4.) specifiek was voor MCF-7 borstkankercellen, werd het 5D10 muis antilichaam en het 1D8 chimeer antilichaam gebruikt in een "chromium release" test met Daudi target cellen (humane lymfoblast cellen). De test bleek negatief voor verschillende effector/target verhoudingen en verschillende antilichaam concentraties. Het 5D10 muis en 1D8 chimeer antilichaam waren niet in staat de Daudi cellen te lyseren. Dit bewijst de specificiteit van het lytisch effect van het monoclonaal en chimeer antilichaam.

B.) De invloed van de antilichaam concentraties op de ADCC werd nagegaan in een "chromium release" test met variërende antilichaam concentraties (0 μ g, 5 μ g, 10 μ g en 25 μ g/ml) en een constante effector /target verhoudingen van 100:1.

Figuur 6.5. : De invloed van de antilichaam concentraties op de MCF-7 borstkankercellen bij éézelfde effector/target verhouding van 100:1. De specifieke lyse van het 5D10 antilichaam, 1D8 chimeer en een irrelevant humaan IgG1 antilichaam werd uitgezet voor verschillende antilichaam concentraties.



Hierbij probeerden we enerzijds na te gaan of geen hogere ADCC met het 1D8 chimeer antilichaam kon worden bekomen bij hogere antilichaam concentraties en anderzijds werd nagegaan welke de kleinste hoeveelheid antilichaam is voor enig cytotoxisch effect (Kaluza e.a., 1991). De specifieke lyse op de target cellen (MCF-7 cellen) werd bepaald voor het 5D10 monoclonaal, het 1D8 en het IgG1 irrelevant humaan antilichaam bij éénzelfde effector/target verhouding van 100:1. De waarden werden eveneens gecorrigeerd van het rechtstreeks effect van de effector cellen (PBLs) op de target cellen (MCF-7 cellen). Dit effect bedroeg hier 4 %. De bekomen waarden werden uitgezet in grafiek (zie figuur 6.5). Een cytotoxisch effect kon nog worden waargenomen vanaf 5 µg 1D8 chimeer antilichaam.

3.) Daar uit de voorafgaande experimenten blijkt dat het chimeer 1D8 antilichaam een lager cytotoxisch effect op MCF-7 cellen vertoont t.o.v. het oorspronkelijke 5D10 muis antilichaam, werd nagegaan of geen verhoogde lyse kon worden waargenomen in aanwezigheid van een ander type effectorcellen namelijk gestimuleerde effectorcellen (PBLs) (Hutzell e.a., 1991; Hand e.a., 1992). Dit om aan te tonen of de Fc-staart van het 1D8 chimeer antilichaam misschien beter zou interageren met gestimuleerde effectorcellen. Deze effectorcellen weerspiegelen ook beter de *in vivo* situatie.

Mononucleaire effectorcellen (PBLs) uit humaan bloed werden gestimuleerd met PHA (2 µg/ml/10⁶ cellen) of IL2 (100 units/ ml) met een incubatietijd van 2 dagen, toegevoegd aan de target cellen (MCF-7 cellen) aan verschillende effector/target verhoudingen.

De resultaten van deze cytotoxiciteitstesten, uitgevoerd met gestimuleerde (PHA en IL2) effectorcellen werden uitgezet in tabel 6.1. Hieruit bleek dat de effectorcellen na stimulatie duidelijk een rechtstreeks cytotoxisch effect hadden op de MCF-7 cellen waardoor de cytotoxische werking van de antilichamen zelf, moeilijk te zien was.

tabel 6.1. : De invloed van de antilichamen met gestimuleerde effector cellen (PBLs) op de ADCC werd aangetoond in een "chromium release" test met verschillende effector/target verhoudingen.

Stimulatie	E:T	0 μ g	5D10 AL	1D8 AL	IgG1 AL
PHA	10:1	9.30 %	11.00 %	9.80 %	9.50 %
	50:1	12.60 %	24.50 %	13.00 %	15.00 %
	100:1	17.40 %	44.70 %	19.00 %	19.70 %
Interleukine 2	10:1	59.50 %	46.00 %	64.70 %	43.00 %
	25:1	77.30 %	60.00 %	78.60 %	76.70 %
	50:1	99.90 %	92.00 %	99.30 %	83.70 %

6.5. Bespreking

Om intact en gezuiverd chimeer antilichaam te bekomen werd het supernatans van de 1D8 kloon gezuiverd m.b.v. proteïne-A Sepharose chromatografie. De opbrengst bedroeg 330 ng/ml/ 10^6 cellen/48 uur. De gesecreteerde hoeveelheid 1D8 chimeer antilichaam ligt in dezelfde grootte orde als reeds eerder afgeleide SP2/0 transfectoma's (Liu e.a., 1987; Hoogenboom e.a., 1990). Na de zuivering werd de bindingscapaciteit van het chimeer antilichaam aangetoond met FACS-analyse en ELISA-testen. Het 1D8 chimeer antilichaam bond met een vergelijkbare capaciteit aan de MCF-7 cellen als het oorspronkelijk 5D10 muis antilichaam wat wijst op een actief chimeer antilichaam. De binding van het chimeer 1D8 aan de MCF-7 cellen werd aangetoond vanaf 2 μ g aan 5×10^5 MCF-7 cellen.

De cytotoxische activiteit van het chimeer antilichaam werd aangetoond in een "chromium release" test in de aanwezigheid van effectorcellen (PBLs). De beste resultaten werden bekomen met niet gestimuleerde effectorcellen uit humaan bloed aan een effector / target verhouding (E/T) van 100 : 1. De cytotoxische aktiviteit van het 1D8 chimeer antilichaam was beduidend lager als deze bekomen met het 5D10 muis antilichaam. Het 5D10 antilichaam (10 μ g/ml) vertoont een lytisch effect van 20-30 % bij een E/T verhouding van 100 : 1 in tegenstelling tot het chimeer antilichaam dat slechts een lytisch effect vertoont van ongeveer 10 %. De invloed van de antilichaam

concentraties op de ADCC werd nagegaan in een "chromium release" test met variërende antilichaam concentraties bij éénzelfde effector/target verhouding van 100:1. Het cytotoxisch effect van het chimeer antilichaam kon worden waargenomen vanaf 5 $\mu\text{g/ml}$.

HOOFDSTUK 7 : DISCUSSIE EN BESLUIT

7.1. Amplificatie en klonering van de V-genen

Met behulp van de PCR-techniek (Saiki e.a., 1985) en specifieke oligonucleotiden voor de amplificatie van muis immunoglobuline genen (Orlandi e.a., 1989; Bendig en Jones, 1991), werden de variabele gebieden van het 5D10 antilichaam, vertrekkende van het totale RNA uit de 5D10 producerende hybridomacellijn (Plessers e.a., 1986), geïsoleerd. Omdat er een kans bestond dat tijdens de PCR-reaktie het Taq polymerase foute nucleotiden in het DNA-fragment inbouwt (Saiki e.a., 1988), werden voor de isolatie van de variabele gebieden verschillende onafhankelijke PCR-reakties uitgevoerd. De DNA-sequenties werden steeds met elkaar vergeleken en er werd slechts éénmaal een fout nucleotide teruggevonden. Na de amplificatie werden de variabele gebieden overgebracht naar specifieke M13 vectoren, voorzien van een expressiecassette.

7.2. De constructie van het muis/mens chimeer antilichaam

Het maken van chimere antilichamen door het aanéenschakelen van genen kan op verschillende manieren gebeuren, namelijk met of zonder een intron tussen het variabele en het constante gebied. Beide methoden kunnen functionele antilichamen op leveren na transfectie maar het is niet bekend welke chimere Ig-genen het best tot expressie zullen komen. Er werd geopteerd voor de aanmaak van chimere genen met een intron tussen het V- en C-gebied omdat het beschreven is in de literatuur dat een dergelijk construct aanleiding kan geven tot een verhoogde productie. Voor de aanéenschakeling van de genen werd beroep gedaan op de PSV-vectoren die ontwikkeld werden door Prof. G. Winter (MRC, Cambridge). In deze PSV-vectoren werd een restrictie-plaats gemaakt tussen beide segmenten voor de koppeling van V- en C-gebied. Door de klonering van de M13 expressiecassettes in de PSV-vectoren, werden de V-genen door een niet-coderend gebied (intron) aan de C-genen gekoppeld. Hierdoor

werden beide chimere constructen onder controle van een Ig-"enhancer" en een Ig-promotor geplaatst.

7.3. Expressie van de chimere genen

Voor de transfectie van de chimere constructen in de SP2/0-Ag14 cellijn, werd gebruik gemaakt van de elektroporatie-techniek (Potter e.a., 1984) vermits deze methode een hoge transfectie-efficiëntie voor alle celtypes verzekert (Sahagan e.a., 1986). Tevens werd aangetoond dat de produktie van alleen de zware keten een toxisch effect kan hebben op de cellen (Köhler, 1980; Haas en Wable, 1984), daarom kozen we voor een sequentiële transfectie waarbij eerst de chimere lichte keten geïntroduceerd werd in de niet-producerende cellijn, gevolgd door een transfectie van de chimere zware keten.

Na de transfectie van de chimere lichte keten werden de cellen opgekweekt in selectief medium. Het percentage "hoge" producers lag op 8 %. Aan de hand van een specifieke ELISA werd een goed producerende kloon van de chimere lichte keten 0C4IIB5 geïsoleerd en gebruikt voor transfectie van de chimere zware keten. Om de transfectie-efficiëntie te verhogen werd het DNA gelineariseerd (Johnson en Phelps, 1988) en geëlectroporeerd. Na de incubatie op selectief medium van de cellen getransfecteerd met *PvuI* gelineariseerd DNA, lag het percentage hoge producers op 20 % waarvan de 1D8 kloon de hoogste produktie (tussen 0,2 en 0,5 µg/ ml/ 10⁶ cellen/ 48 u) had. De gesecreteerde hoeveelheid werd vergeleken met waarden weergegeven in de literatuur (Sahagan e.a., 1986). Transfectoma's maken over het algemeen slechts 0,5 tot 5 % van de hoeveelheid antilichaam aan van een hybridoma. Het is nog niet duidelijk waarom deze productie lager ligt nog waarom er een hoge variabiliteit van productieniveau is (Brown e.a., 1987). Alhoewel de cel verschillende copijen van Ig-genen kan integreren in zijn genoom bestaat er geen verband tussen het aantal genen en de productie. Waarschijnlijk heeft de plaats van integratie van het gen een belangrijke invloed op de transcriptie. De produktie-waarden gevonden voor het 1D8 chimeer antilichaam waren van dezelfde grootte orde als reeds eerder afgeleide SP2/0 transfectoma's (Liu e.a., 1987; Hoogenboom e.a., 1990; Vandevyver e.a., 1993). De produktie van de 1D8 kloon bleek gedurende geruime tijd stabiel, het supernatans van de kloon werd dan ook gebruikt voor verdere karakterisatie van het chimeer

antilichaam. De kwaliteit van het chimeer antilichaam werd nagegaan met SDS-PAGE en immunoblot analyses. Het moleculair gewicht van de chimere ketens kwam overeen met deze van het oorspronkelijke muis antilichaam. Voor het bekomen van zuiver antilichaam werd het supernatans van de 1D8 kloon opgezuiverd m.b.v. affiniteitschromatografie.

7.4. Bindingsactiviteit van het chimeer antilichaam

De *in vitro* bindingsspecificiteit van het muis/mens chimeer antilichaam werd getest op MCF-7 borstkankercellen met behulp van ELISA-technieken en FACS-analysen. In de ELISA-test zijn de MCF-7 borstkankercellen gefixeerd met glutaraaldehyde maar de bindingsspecificiteit van het 1D8 chimeer antilichaam blijft bewaard en vertoont vergelijkbare waarden als voor het 5D10 muis antilichaam. Aan de hand van FACS-analysen werd aangetoond dat de bindingscapaciteit op levende cellen na chimerisatie behouden blijft. Deze testen geven weer dat het 1D8 chimeer antilichaam net zoals het 5D10 antilichaam een tumor geassocieerd antigeen op de MCF-7 borstkankercellen herkent.

De *in vitro* cytotoxiciteit van het chimeer antilichaam werd aangetoond met een "chromium release" test in de aanwezigheid van effectorcellen (PBLs) uit humaan bloed. Het supernatans van de 1D8 kloon had een cytotoxisch effect op de MCF-7 cellen en niet op de Daudi cellen wat de specificiteit van het chimeer antilichaam aantoont. Het cytotoxisch effect veroorzaakt door het 1D8 chimeer antilichaam was van een lager orde als dat veroorzaakt door het 5D10 muis antilichaam. Deze daling kan te wijten zijn aan verschillende factoren. De glycosylatie van de C-gebieden speelt een belangrijke rol in de cytotoxische activiteit van het antilichaam. Een verminderde glycosylatie van een chimeer antilichaam in het CH2 domein kan de cytotoxische activiteit van het antilichaam elimineren (Hand e.a., 1992). De binding van het chimeer antilichaam aan de kankercellen kan beïnvloed worden door verandering van een aantal nucleotiden in de FR-gebieden van de V-genen met het gebruik van immunoglobuline specifieke oligonucleotiden in de PCR-reactie (Orlandi e.a., 1989). Toch werd nog niet aangetoond of het gebruik van de oligonucleotiden voor de constructie van een chimeer

antilichaam een daling van de cytotoxische activiteit van het antilichaam kan veroorzaken.

Mutaties in het Fc-gedeelte van het antilichaam zorgen eveneens voor een lagere activiteit (Alegre e.a., 1992). De sequentie die codeert voor het humaan C-gamma gebied stemde nochtans overéén met deze beschreven in de literatuur (Honjo e.a., 1979) wat de mogelijkheid op mutaties in het Fc-gebied elimineert.

7.5. Besluit

Na de isolatie van de V-genen via de PCR-reactie met Ig-specifieke oligonucleotiden (Meulemans e.a., 1990-1993), werden de genen gekloneerd en werd de chimerisatie van het 5D10 antilichaam met succes uitgevoerd. Na de transfectie van de constructen via elektroporatie, werd een stabiele cellijn 1D8, die de verwachte muis/mens chimere ketens secreteert, afgezonderd. De antigeenbinding van het chimeer antilichaam aan de MCF-7 borstkankercellen bleef behouden.

Na het chimeriseren van het 5D10 antilichaam verwacht men dat de immuunreacties die optreden in de mens, sterk gereduceerd zijn t.o.v. het oorspronkelijke muis antilichaam. De immunogeniciteit in de mens blijft immers beperkt tot een anti-idiotypische reactie (Brüggemann, 1989). Normaal zou de anti-tumor activiteit van het chimeer antilichaam moeten toenemen t.o.v. het muis antilichaam, door de vervanging van het Fc-gedeelte door de humane IgG1-subklasse (Bindon e.a., 1988), door een verhoogde halfwaardetijd (Steplewski e.a., 1988; LoBuglio e.a., 1989) en door een betere interactie met het immuunsysteem.

Omdat het chimeer antilichaam het tumor geassocieerd antigeen op de MCF-7 borstkankercellen herkent, komt het antilichaam in aanmerking voor *in vivo* diagnostiek om borstkankercellen en metastasen aan te tonen in het lichaam.

7.6. Opties voor verder onderzoek

Voor het gebruik van het chimeer antilichaam in therapie zal een verbetering van de expressie van het construct nodig zijn. Volgens therapeutische normen heeft men meerdere mg chimeer antilichaam nodig zodat een verhoging van de produktie noodzakelijk is. Dit kan men verwezenlijken door de constructen te voorzien van een sterkere promotor die de expressie van het chimeer antilichaam opdrijft (Kaluza e.a., 1991). Verder kan het testen van het chimeer antilichaam in een *in vivo* muizen model, de bruikbaarheid ervan in therapie aantonen.

Vermits het chimeer antilichaam een tumor geassocieerd antigeen herkent maar de anti-tumoractiviteit via de Fc-staart van het antilichaam gedaald is, zou de aanmaak van een scFv-fragment in combinatie met een toxine een mogelijke oplossing kunnen zijn voor het verkrijgen van een betere lyse van de borstkankercellen (Chaudhary e.a., 1989). Door hun kleine omvang kunnen scFv-fragmenten immers beter doordringen in dense tumoren (Colcher e.a., 1990; Yokota e.a., 1992).

SAMENVATTING

Monoclonale antilichamen die gebruikt worden voor *in vivo* diagnostiek en humane therapie moeten bij voorkeur van humane oorsprong zijn. Om de immunogeniciteit van dierlijke antilichamen te reduceren worden chimere antilichamen gemaakt. Het doel van deze studie is een chimeer antilichaam te construeren dat gericht is tegen humane borstkankercellen. Een monoclonaal antilichaam 5D10 (IgG3) gericht tegen de humane borstkankercellijn MCF-7 werd aangemaakt door het fusioneren van miltcellen van een geïmmuniseerde muis met muis SP2/0 cellen (Plessers e.a., 1986). Dit 5D10 antilichaam bleek een aneuploidie-geassocieerd antigeen te herkennen.

Het RNA van de muis hybridoma cellijn die het 5D10 antilichaam aanmaakt, werd geïsoleerd. cDNA's die coderen voor de variabele gebieden van de lichte en zware keten van het 5D10 antilichaam werden selectief gesynthetiseerd door gebruik te maken van Ig-specifieke oligonucleotiden. Na de isolatie van de genen die coderen voor het V_H- en V_K-fragment van het 5D10 antilichaam met de PCR-reactie, werden ze overgebracht naar expressievectoren. Het zware keten variabel gebied codeert een volledig intact variabel gen, dat de meeste homologie vertoont met de variabele Ig-sequenties in klasse IIA. Het lichte keten variabel gebied behoort tot klasse II.

Via de klonering van de genen coderend voor de variabele gebieden van het muis antilichaam, in specifieke PSV-vectoren (bekomen van Prof. G. Winter, MRC, Cambridge, UK) werden muis/mens chimere genen geconstrueerd. De V-genen werden door een niet-coderend gebied gekoppeld aan de genen die coderen voor de constante gebieden van een humaan antilichaam. De constructen werden voorzien van een antilichaam "enhancer", promotor, signaalpeptide sequentie en een selectiegen : *gpt* of *hyg*. De chimere Ig-ketens werden achtereenvolgens in de SP2/0 myeloma cellijn getransfecteerd.

Transfectoma's die het chimeer antilichaam secreteerden, werden geïdentificeerd via selectie met het gepaste medium en screening met ELISA. Het chimeer antilichaam werd gekarakteriseerd met gelelektroforese en immunoblot analyses. De ketens hebben de verwachte grootte en blijken intact te worden gesecreteerd. De bindingsspecificiteit van het chimeer antilichaam aan de MCF-7 borstkankercellen werd aangetoond met ELISA- en FACS-analysen en bleef behouden.

De anti-tumor activiteit van het chimeer antilichaam werd aangetoond in een "chromium release" test maar lag lager als voor het oorspronkelijke muis antilichaam. Verder onderzoek naar de activiteit van het chimeer antilichaam zal het werkingsmechanisme en de anti-tumor activiteit van het eiwit kunnen verklaren. Vermits het chimeer antilichaam het tumor geassocieerd antigeen op de MCF-7 borstkankercellen herkent, kan het aangewend worden voor de opsporing van metastasen en borsttumoren in patiënten.

REFERENTIES

- Alegre, M.L., A.M. Collins, V.L. Pulito, R.A. Brosius, W.C. Olsen, R.A. Zivin, R. Knowles, J.R. Thistlethwaite, L.K. Jolliffe, en J.A. Bluestone. 1992. Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a humanized OKT3 monoclonal antibody. *The journal of Immunology* 148 : 3461.
- Auer, G., E. Eriksson, E. Azavedo, T. Caspersson, en A. Wallgren. 1984. Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. *Cancer Res.* 44 : 394.
- Aviv, H. en P. Leder. 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 : 1408.
- Batra, J.K., V.K. Chaudhary, D.J. Fitzgerald, en I. Pastan. 1990. TGF alpha-anti-Tac (Fv)-PE40 : a bifunctional toxin cytotoxic for cells with EGF or IL2 receptors. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 171 :1.
- Batra, J.K., D.J. Fitzgerald, V.K. Chaudhary, en I. Pastan. 1991. Single-chain immuntoxin directed at the human transferring receptor containing *Pseudomonas* exotoxin A or diphtheria toxin anti-TRF (Fv)-PE40 and DT-388-anti-TRF (Fv). *Molec. Cell. Biol.* 11 : 2200.
- Beatty, J.D., L.E. Williams, D. Yamauchi, B.A. Morton, R. Hill, B.G. Beatty, R.J. Paxton, B. Merchant, J.E. Shively. 1990. Presurgical imaging with indium-labeled anti-carcinoembryonic antigen for colon cancer staging. *Cancer Res.* 50 [supp.] : 922.
- Beauchemin, N., S. Benchimol, D. Cournoyer, A. Fuks, en CP Stanners. 1987. Isolation and characterization of full length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 3221.
- Beidler, C.B., J.R., Ludwig, J. Cardenas, J. Phelps, C.G. Papworth, E. Melcher, M. Sierzega, L.J. Myers, B.W. Unger, M. Fisher, G.S. David, M.J. Johnson. 1988. Cloning and high level expression of a chimeric antibody with specificity for human carcino-embryonic antigen. *J. Immunol.* 141 : 4053.
- Better, M., C.P. Chang, R. Robinson, en A.H. Horwitz. 1988. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240 : 1041.
- Bindon, C.I., G. Hale, M. Brüggemann, en H. Waldmann. 1988. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J. Exp. Med.* 168 : 127.

- Bird, R.E., K.D. Hardma,, J.W. Jacobson, S. Johnson, B.M Kaufman, S.M. Lec, T. Lee, S.H. Pope, G.S. Riordan, M. Hitlow. 1988. Single-chain antigen binding fragment. *Science* 242 : 423.
- Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 100 : 243.
- Boulianne, G.L., N. Hozuma, en M.J. Shulman. 1984. Production of a functional chimeric mouse/human antibody. *Nature* 312 : 643.
- Brabon, A.C., J.F. Williams, en R.D. Cardiff. 1984. A monoclonal antibody to a human breast tumor protein released in response to estrogen. *Cancer Res.* 44 : 2704.
- Bremer, E.G., S.B. Levery, S. Sonnino, R. Ghidoni, S. Canevari, R. Kannagi, en S. Hakomori. 1984. Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody Mbr1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J. Biol. Chem.* 23 : 1473.
- Brown, B.A., G.L. Davies, J. Saltzgaber-Müller, P. Simon, M.K. Ho, P.S. Show, B.A. Stone, H. Sands, en G.P. Moore. 1987. Tumor specific genetically engineered murine/human chimeric monoclonal antibody. *Cancer Res.* 47 : 3577.
- Brüggemann, M., G.T. Williams, C.I. Bindon, M.R. Clark, M.R. Walker, R. Jefferis, H. Waldmann, en M.S. Neuberger. 1987. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J. Exp. Med.* 166 : 1351.
- Brüggemann, M., C. Teale, M. Clark, C. Bindon, en H. Waldmann. 1989. A matched set of rat/mouse chimeric antibodies. *The Journal of Immunology* 142 N°9 : 3145.
- Cabilly, S., A.D. Riggs, H. Pande, J.E. Shively, W.E. Holmes, M.R. Rey, L.J. Perry, R. Wetzell, en H.L. Heyneker. 1984. Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 3273.
- Campbell, A.M. 1987. *Monoclonal antibody technology*. Uitg. H.R. Burdon en P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam, Nederland.
- Canevari, S., R. Orlandi, M. Ripamonti, A. Tagliabue, E. Aguanno, S. Miotti, S. Ménard, en M.L. Colnaghi. 1985. Ricin a chain conjugated to human carcinomas selectively kills human carcinoma cells *in vitro*. *J. Nat. Cancer Inst.* 75 : 831.
- Capon, D.J., S.M. Shamow, J. Mordenti, S.A. Marsters, T. Gregory. H. Mitsuya, R.A. Byrn, C. Lucas, F.M. Wurm , en J.E. Groopman. 1989. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 337 : 525.

Chaudhary, V.K., C. Queen, R.P. Junghans, T.A. Waldmann, D.J. FitzGerald, en I. Pastan. 1989. A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature* 339 : 394.

Chaudhary, V.K., M.G. Gallo, D.J. FitzGerald, I. Pastan. 1990. A recombinant single chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 9491.

Chin, Y., L. Plessers, J. Vandepitte, en J. Raus. 1991. A murine monoclonal antibody to human breast cancer cells associated with DNA ploidy status. *Eur. J. Cancer* 27 : 48.

Chomczynski, P. 1989. Isolation of RNA by the RNAzol B method. *Cinna/Biotech Bulletin* 3.

Clackson, T., H.R. Hoogenboom, A.D. Griffiths, en G. Winter. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352 : 624.

Colcher, D., P. Horan-Hand, M. Nuti, J. Schlom. 1981. A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78 : 3199.

Colcher, D., J.M. Esteban, J.A. Carrasquillo, P. Sugarbaker, J.C. Reynolds, G. Bryant, S.M. Larson, en J. Schlom. 1987. Complementation of intracavitary and intravenously administered mAb B72.3 in patients with carcinoma. *Cancer Res.* 47 : 4218.

Colnaghi, M.L., S. Andreola, A. Diotti, S. Ménard, S. Miotti, S. Orefice, S.M. Pupa, en E. Tagliabue. 1987. Immunodiagnosis of human carcinomas using monoclonal antibodies. In : F. Cimino, G.D. Birkmayer, J.V. Klavins, E. Pimentel, en F. Salvatore (eds.), *Human tumor markers* : pp. 377, W. de Gruyter, Berlin.

Co, M.S., M. Deschamps, R. J. Whitley, en C. Queen. 1991. Humanised antibodies for antiviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 2869.

Colcher, D., D. Milenic, M. Roselli, A. Raubitschek, G. Yarranton, D. King, J. Adair, N. Whittle, M. Bodmer, en J. Schlom. 1989. Characterization and biodistribution of recombinant and recombinant/chimeric constructs of monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res.* 49 : 1738.

Colcher, D., R. Bird, M. Roselli, K.D. Hardman, S. Johnson, S. Pope, S.W. Dodd, M.W. Pantaliano, D.E. Milenic, J. Schlom. 1990. *In vivo* tumor targeting of recombinant single-chain antigen-binding protein. *J. Natl. Cancer Inst.* 82 : 1191.

Davies, J., en A. Jimenez. 1980. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 : 1089.

- Dempsey, P.J., F.P. Feleppa, R.W. Brown, T.A. de Kretser, R.H. Whitehead, en D.G. Jose. 1986. Development of monoclonal antibodies to the human breast carcinoma cell line PMC42. *JNCI* 77 : 1.
- Dillman R.O. 1990. Human antimouse and antiglobulin responses to monoclonal antibodies. *Immunconj. Radiopharm.* 3 : 1.
- Edwards, P.A., C.M. Smith, A.M. Neville, en M.J. O'Hare. 1982. A human-human hybridoma system based on a fast-growing mutant of the ARH-77 plasma cell leukemia-derived line. *Eur. J. Immunol.* 12 : 641.
- Ellison, J.W., B.J. Berson en L.E. Hood. 1982. The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C gamma 1 gene. *Nucleic Acids Research* 10 N°13 : 4071.
- Erlich H.A. 1989. *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York, VS.
- Esteban, J.M., D. Colcher, P. Sugarbaker, J.A. Carrasquillo, G. Bryant, A. Thor, J.C. Reynolds, S.M. Larson, J. Schlom. 1987. Quantitative and qualitative aspects of radiolocalization in colon cancer patients of intravenously administrated mAb B72.3. *Int. J. Cancer* 39 : 50.
- Ey, P.L., S.J. Prowse, en C.R. Jenkin. 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protéine A-sepharose. *Immunochemistry* 15 : 429-436.
- Gascoigne, N.R., C.C. Goodnow, K.L. Dudzik, V.T. Oi, en M.M. Davies. 1987. Secretion of a chimeric T-cell receptor-immunoglobulin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2936.
- Gavilondo-Comley, J.V., M. Coloma, J. Vasquez, M. Ayala, A. Macias, K.E. Fry, en J.W. Larrick. 1990. Specific amplification of rearranged immunoglobulin variable region genes from mouse hybridoma cells. *Hybridoma* 9 : 407.
- Gillies, S.D., J.S. Wesolowski, en K.M. Lo. 1991. Targeting human cytotoxic T lymphocytes to kill heterologous epidermal growth factor receptor-bearing tumor cells. *J. Immunol.* 146 : 1067.
- Gold, P., en S.O. Freedman. 1965. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122 : 467.
- Goldenberg, D.M., H. Goldenberg, R.M. Sharkey. E. Higginbotkam-Ford, R.E. Lee, L.C. Swayne, K.L. Burger, D. Tsai, J. Horowitz, T.C. Hall, C.M. Pinsky, HJ. Hansen. 1990. Clinical studies of cancer radioimmunodetection with carcinoembryonic antigen monoclonal antibody fragments labeled with ^{123}I or $^{99\text{m}}\text{Tc}$. *Cancer Res.* [suppl.] 50 : 909.

Gross, G., T. Waks, en Z. Eshhar. 1989. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 10024.

Haas, L.G., en M.R. Wabl. 1984. Immunoglobulin heavy chain toxicity in plasma cells is neutralised by fusion to pre-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 7185.

Hale, G., M.R. Clark, R. Marcus, G. Winter, M.J.S. Dyer, J.M. Phillips, L. riechmann, en H. Waldmann. 1988. Remission induction in non Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody Campath-1H. *Lancet II* : 1394.

Hand, P.H., P.F. Robbins, M.L. Salgaller, D.J. Poole, en J. Schlom. 1992. Evaluation of human carcinoembryonic-antigen (CEA)-transduced and non transduced murine tumors as potential targets for anti-CEA therapies. *Cancer Immunol. Immunother.* 36 : 65.

Hartman, S. C., en R.C. Mulligan. 1988. Two dominant-acting selectable markers for gene transfer studies in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 8047.

Hasemann, C.A., en J.D. Capra. 1990. High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 3942.

Hasting, A., L.A. Wims, en S.L. Morrison. 1991. Novel vectors for cloning PCR products as complete chimeric antibody molecules.

Hieter, A.P., E.E. Max, J.G. Seidman, J.V. Maizel en P. Leder. 1980. Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. *Cell* 22 : 197.

Honjo, T., M. Obata, Y. Yamawaki-Kataoka, T. Kataoka, T. Kawakami, N. Takahashi en Y. Mano. 1979. Cloning and complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin gamma 1 chain gene. *Cell* 18 : 559.

Hoogenboom, H.R., J. Raus en G. Volckaert. 1990. Cloning and expression of a chimeric antibody directed against the human transferrin receptor. *J. Immunol.* 144 : 3211.

Hoogenboom, H.R., J. Raus en G. Volckaert. 1991. Targeting of tumor necrosis factor to tumor cells : secretion by myeloma cells of a genetically engineered antibody-tumor necrosis factor hybrid molecule. *Biochemica et Biophysica Acta* 1096 : 345.

Hoogenboom, H.R., G. Volckaert, en J. Raus. 1991. Construction and expression of antibody-tumor necrosis factor fusion proteins. *Molecular Immunology* 28 N°9 : 1027.

Horwitz, A.H., C.P. Chang, M. Better, en K.E. Hellström. 1988. Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 8678.

Huston, J.S., D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.S. Tai, J. Novotny, M.N. Margolies, R.J. Ridge, R.E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea, en H. Oppermann. 1988. Protein engineering of antibody binding sites : recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 5879.

Hutzell, P., S. Kashmiri, D. Colcher, F.J. Primus, P. Joran Hand, M. Raselli, M. Finch, G. Yarranton, M. Bodmer, N. Whittle, D. King, C.C. Loullis, D.W. McCoy, R. Callahan, en J. Schlom. 1991. Generation and characterization of a recombinant/chimeric B27.3 (human $\gamma 1$). *Cancer Research* 51 :181.

Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, en G. Winter. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321 : 522.

Jones, S.T. en M.M. Bendig. 1991. Rapid PCR-cloning of full length mouse immunoglobulin variable regions. *Biotechnology* 9 : 88.

Johnson, M.J., en J. Phelps. 1988. Effects of vector linearization sites on the expression of transfected genes. *Focus* 10 : 75.

Jungmans, R.P., T.A. Waldmann, N.F. Landolfi, N.M. Avdalovic, W.P. Schneider, en C. Queen. 1990. Anti-Tac-H, a Humanised Antibody to the Interleukin 2 Receptor with New Features for Immunotherapy in Malignant and Immune Disorders. *Cancer Research* 50 : 1495.

Kabat, E.A., T.T. Wu, M. Reid-Miller, H.M. Perry, en M. Gottesman. 1987. *Sequences of proteins of immunological interest*. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Bethesda, MD, VS.

Kaluza B., H. Lenz, E. Russmann, H. Hock, O. Rentrop, O. Majdic, W. Knapp, en U.H. Weidle. 1991. Synthesis and functional characterization of a recombinant monoclonal antibody directed against the α -chain of the human interleukin-2 receptor. *Gene* 107 : 297.

Koga, H., H. Kanda, M. Nakashima, Y. Watanabe, K. Endo, en T. Watanabe. 1990. Mouse-human chimeric monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (CEA) : *in vitro* and *in vivo* activities. *Hybridoma* 9 : 43.

Köhler, G. 1980. Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 2197.

Köhler, G. , en C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256 : 495.

Kreitman, R.J., V.K. Chaudhary, T. Waldmann, M.C. Willingham, D.J. Fitzgerald, en I. Pastan. 1990. The recombinant immunotoxin anti-Tac (Fv)-Pseudomonas exotoxin 40 is cytotoxic toward peripheral blood malignant cells from patients with adult T-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 9491.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680.

Landolfi, N.F. 1991. A chimeric IL2/Ig molecule possesses the functional activity of both proteins. *J. Immunol.* 146 : 2446.

Larrick, J.W., L. Daniëlsson, C.A. Brenner, E.F. Wallace, M. Abrahamson, K.E. Fry, en C.A. Borrebaeck. 1989. Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 160 : 1250.

Larrick, J.W., L. Daniëlsson, C.A. Brenner, E.F. Wallace, M. Abrahamson, K.E. Fry, en C.A. Borrebaeck. 1989. Polymerase chain reaction using mixed primers : cloning of human monoclonal antibody variable region genes from single hybridoma cells. *Biotechnology* 7 : 934.

Le Boeuf, R.D., F.S. Galin, S.K. Hollinger, S. C. Peiper, en J.E. Blalock. 1989. Cloning and sequencing of immunoglobulin variable region genes using degenerate oligodeoxyribonucleotides and polymerase chain reaction. *Gene* 82 : 371.

Levy, S., E. Mendel, en S. Kon. 1987. A rapid method for cloning and sequencing variable region genes of expressed immunoglobulins. *Gene* 54 : 167.

Li, Y.W., D.K. Lawrie, P. Thammana, G.P. Moore, en C.W. Shearman. 1990. Construction, expression and characterization of a murine/human chimeric antibody with specificity for hepatitis B surface antigen. *Molec. Immunol.* 27 : 303.

Liao, S-K, P.B. Avner, C. Meranda, en T. Kanamura. 1987. Monoclonal antibody BTMA8 with apparant selective specificity for adenocarcinomas of breast, colorectal, and pancreas. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 28 : 362.

Liao, S-K, C. Meranda, B.P. Avner, T. Romano, S. Hussein, B. Kimbro, en R.K. Oldham. 1989. Immunohistochemical phenotyping of human solid tumors with monoclonal antibodies in devising biotherapeutic strategies. *Cancer Immunol. Immunother.* 28 : 77.

Liu, A.Y., R.R. Robinson, K.E. Hellström, E.D. Murray, Jr.C.P. Chang, en I. Hellström. 1987. Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 : 3439.

- LoBuglio, A.F., R.H. Wheeler, J. Trang, A. Haynes, K. Rogers, E.B. Harvey, L. Sun, J. Ghrayeb, en M.B. Khazaeli. 1989. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man : Kinetics and immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 4220.
- Maguire, R.T., R.F. Schmelter, V.L. Pacucci, en J.J. Conklin. 1989. Immunoscintigraphy of colorectal adenocarcinoma. Results with a site-specifically radiolabeled B72.3 (^{111}In -CYT-103). *Antibody Immunoconj. Radiopharmacol.* 2 : 257.
- Mandel, M., en A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53 : 159.
- Marks, J.D., A.D. Griffiths, M. Malqvist, T.P. Clackson, J. M. Bye, en G. Winter. 1992. By-passing immunization : building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology* 10 : 779.
- Marks, J.D., H. Hoogenboom, A.D. Griffiths, en G. Winter. 1992. Molecular evolution of proteins on filamentous phage. *The Journal of Biological Chemistry* 267 : 16007.
- Marriuzza, R. en G. Winter. 1989. Secretion of homodimeric $V_{\alpha} C_{\kappa}$ T-cell receptor immunoglobulin chimeric protein . *J. Biol. Chem.* 264 : 7310.
- Mc Cafferty, J., A.D. Griffiths, G. Winter, en D.J. Chiswell. 1990. Phage antibodies : filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348 : 552.
- Ménard, S., E. Tagliabue, S. Canevari, G. Fossati, en M.L. Colnaghi. 1983. Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res.* 43. 1295.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* 101 : 20.
- Meulemans, E., C. Vandevyver, G. Volckaert en J. Raus. 1990. Sequencing of the variable domains of the 5D10 antibody. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 99 : B19. (Abstract)
- Meulemans, E., C. Vandevyver, G. Volckaert en J. Raus. The construction of a mouse/human chimeric 5D10 antibody against human breast cancer cells-amplification, cloning and sequencing of the variable domains of the mouse antibody. *11th European Federation of Immunological Societies*. Helsinki, Finland. 10-12 june 1991. (Abstract)
- Meulemans, E., C. Vandevyver, G. Volckaert en J. Raus. The Construction of a Mouse/Human Chimeric Antibody against Human Breast Cancer Cells. *Congres : "New Generation of monoclonal antibodies in diagnosis and therapy."* 12-15 april 1992. Genoa, Italy. (Abstract)

Meulemans, E., C. Vandevyver, G. Volckaert en J. Raus. 1993. The Construction of a Mouse/Human Chimeric Antibody against Human Breast Cancer Cells. *Year Immunol.* 7. Basel, Karger. In Press.

Miotti, S., F. Leoni, S. Canevari, S. Sonnino, en M.I. Colnaghi. 1989. Immunoblotting detection of carbohydrate epitopes in glycolipids and glycoproteins of tumoral origin. In : H.F. Oettgen (ed.), *Gangliosides and cancer*, pp. 169, VCH Publicers, New York.

Morisson, S.L., M.J. Johnson, L.A. Herzenberg, en V.T. Oi. 1984. Chimeric human antibody molecules : mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 : 6851.

Morrison, S.L., L.A. Wims, en V.T. Oi. 1985. Transfectoma's : a new approach for the production of monoclonal antibodies. In *Monoclonal antibodies 1984 : Biological and Clinical Applications*, 39. Uitg. A Pinchiera, G. Doria, F. Dammacco, and A. Bargellesi. Kurtis, Basel, Zwitserland.

Morrison, S.L., en V.T. Oi. 1989. Genetically engineered antibody molecules. *Adv. Immunol.* 44 : 65-92.

Mulligan, R.C., en P. Berg. 1981. Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 2072.

Neuberger, M.S. 1983. Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *Embo J.* 2 : 1373.

Neumaier, M. L. Shively, F.S. Chen, F.J. Gaida, C. Ilgen, R.J. Paxton, J.E. Shively, en A.D. Riggs. 1990. Cloning of the genes of T84.66, an antibody that has high specificity and affinity for carcinoma-embryonic antigen, and expression of chimeric human/mouse T84.66 genes in myeloma and chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 50 : 2128.

Nishimura, Y., M. Yokoyama, K. Araki, R. Ueda, A. Kudo, en T. Watanabe. 1987. Recombinant human-mouse chimeric monoclonal antibody specific for common acute lymphocytic leukemia antigen. *Cancer Res.* 47 : 999.

Opdenakker, G., H. Weening, D. Collen, A. Billiau en P. De Somer. 1982. Messenger RNA for human tissue plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 121 : 269.

Orlandi, R., S. Canevari, F.P. Conde, F. Leoni, D. Mezzanzanica, M. Ripamonti, en M.I. Colnaghi. 1988. Immunoconjugate generation between the ribosome inactivating protein restrictocin and an anti-human breast carcinoma Mab. *Cancer Immunol. Immunother.* 26 : 114.

Orlandi, R., D.H. Güssow, P.T. Jones, en G. Winter. 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 : 3833.

Orlandi, R., M. Figini, A. Tomassetti, S. Canevari, en M.L. Colnaghi. 1992. Characterization of a mouse-human chimeric antibody to a cancer associated antigen. *Int. J. Cancer* 52 : 588.

Pancino, G., C. Charin, E. Osinaga, B. Bétaille, M. Leroy, F. Calvo, en A. Roseto. 1990. Characterization and distribution in human tissues of a glycoproteic antigen defined by monoclonal antibody 1B12 raised against T47D human breast cancer cell line. *Cancer Res.*

Plessers, L., E. Bosmans, A. Cox, en J. Raus. 1986. Specific monoclonal antibodies reacting with human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 6 : 885.

Plessers, L. 1988. De aanmaak en karakterisatie van monoclanale antilichamen tegen borstkankercellen. Doctoraatschrift.

Plessers, L., E. Bosmans, A. Cox, L. Op de Beeck, J. Vandepitte, J. Vanvuchelen en J. Raus. 1990. Production and immunohistochemical reactivity of mouse anti-epithelial monoclonal antibodies raised against human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 10 : 271.

Plückthun, A., en A. Skerra. 1989. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* 178 : 497.

Potter, H., L. Weir, en P. Leder. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 7161.

Riechmann, L., M. Clark, H. Waldmann, en G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332 : 323.

Rose, T.M., G.D. Plowman, DB Teplow, W.J. Dreyer, K.E. Hellstrom, en J.P. Brown. 1986. Primary structure of human melanoma associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 1261.

Queen, C., W.P. Schneider, H.E. Selick, P.W. Payne, N.F. Landolfi, J.F. Duncan, N.M. Avdalovic, M. Levitt, R.P. Junghans, en T.A. Waldmann. 1989. A humanised antibody that binds to the interleukine 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 10029.

Sahagan, B.G., H. Dorai, J. Saltzgaber-Müller, F. Toneguzzo, C.A. Guindon, S.P. Lilly, K.W. McDonald, D.V. Morrissey, B.A. Stone, G.L. Davis, P.K. McIntosh en G.P. Moore. 1986. A genetically engineered murine/human chimeric antibody retains specificity for human tumor associated antigen. *The Journal of Immunology* 137 N° 3 : 1066.

Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, en N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of Beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350.

Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, en H.A. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487.

Saga, T., K. Endo, M. Koizumi, Y. Kawamura, Y. Watanabe, J. Konishi, R. Ueda, Y. Nishimura, M. Yokoyama, en T. Watanabe. 1990. *In vitro* and *in vivo* properties of human/mouse chimeric monoclonal antibody specific for common acute lymphocytic leukemia antigen. *J. Nucl. Med.* 31 : 1077.

Sahagan, B.G., H. Dorai, J. Saltzgaber-Müller, F. Toneguzzo, C.G. Guindon, S.P. Lilly, K.W. McDonald, D.V. Morrissey, B.A. Stone, G.L. Davies, P.K. McIntosh, en G.P. Moore. 1986. A genetically engineered murine/human chimeric antibody retains specificity for human-associated antigen. *J. Immunol.* 137 : 1066.

Sandlie, I. en T.E. Michaelsen. 1991. Engineering monoclonal antibodies for determine the structural requirements for complement activation and complement mediated lysis. *Molecular Immunology* 28 N°12 : 1361.

Sanger, F., S. Nicklen, en A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 6904-6908.

Schroff, R.W., A.F. Fonn, S.M. Beatty, R.K. Oldham, en C.M. Walton. 1985. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Research* 45 : 879.

Sharkey, R.M., D.M. Goldenberg, H. Goldenberg, R.E. Lee, C. Ballance, D. Pawlyc, D. Varga, H.J. Hansen. 1990. Murine monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen : immunological, pharmacokinetic, and targeting properties in humans. *Cancer Res.* 50 : 2823.

Sharon, J., M.L. Gefter, T. Manser, S.L. Morrison, V.T. Oi, en M. Ptashne. 1984. Expression of a VHCK chimaeric protein in mouse myeloma cells. *Nature* 309 : 364.

Shin, S.U., en S.L. Morrison. 1990. Expression and characterization of an antibody binding specificity joined to insuline life growth factor 1 : Potential applications for cellular targeting. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 87 : 5322.

- Shulman, M., C.D. Wilde, en G. Köhler. 1978. A better celline for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276 : 269.
- Skerra, A., en A. Plückthun. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240 : 1038.
- Skerra, A., I. Pfitzinger, en A. Plückthun. 1991. The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli* : improved vectors and a generally applicable purification strategy. *Biotechnology* 9 : 273.
- Soule, H.D., J. Vasquez, A. Long, S. Albert, en M. Brennan. 1973. A human celline from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51 : 1409.
- Steplewski, Z., L.K. Sun, C.W. Shearman, J. Ghayeb, P. Daddona, en Koprowski. 1988. Biological activity of human/mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with anti-tumor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 4852.
- Sun, L.K., P. Curtis, E. Rakowicz-Szulczynska, J. Ghayeb, N. Chang, S.L. Morrison, en H. Koprowski. 1983. Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against carcinoma-associated antigen 17-1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 214.
- Tai, M.S., M. Mudgett-Hunter, D. Levinson, G.M. Wu, E. Haber, H. Opperman, en J.S. Huston. 1990. A bifunctional fusion protein containing Fc-binding fragment B of Staphylococcal protein A amino terminal to antidigoxin single-chain Fv. *Biochemistry* 29 : 8024.
- Thompson, C.H., S.L. Jones, R.H. Whitehead, en IFC McKenzie. 1983. A human breast cancer tissue-associated antigen detected by a monoclonal antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* 70 : 409.
- Toneguzzo, F., A. C. Hayday, en A. Keating. 1986. Electric field mediated DNA transfer : transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 703.
- Traunecker, A., J. Schneider, H. Kiefer, en K. Karjalainen. 1989. Highly efficient neutralisation of HIV with recombinant CD4-immunoglobulin molecules. *Nature* 339 : 68.
- Vandevyver, C., M. Steukers, J. Lambrechts, H. Heyligen, en J. Raus. 1993. Development and functional characterisation of a murine human chimeric antibody with specificity for human Interleukin-2 receptor. *Molecular Immunology*. In Press.

Vandevyver, C., M. Steukers, J. Lambrechts, Y. Chin, E. Meulemans, en J. Raus. 1993. Purification and characterization of an antigen defined by a monoclonal antibody raised against the human breast cancer line MCF-7. *Archives Int. Physiol. Biochim.* 101, B36 (abstract).

Verhoeyen, M., C. Milstein, en G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies : grafting an antilysozyme activity. *Science* 239 : 1534.

Volckaert, G. 1988. A systematic approach to chemical DNA sequencing by subcloning in PGV451 and derived vectors. *Methods Enzymol.* 155 : 231.

White, C.A., R. Dulbecco, R. Allen, M. Bowman, en B. Armstrong. 1985. Two monoclonal antibodies selective for human mammary carcinoma. *Cancer Res.* 45 : 1337.

Wigler, M., M. Perucho, D. Kurtz, S. Dana, A. Pellicer, R. Axel, en S. Silverstein. 1980. Transformation of mammalian cells with an amplifiable dominant-acting gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 3567.

Wreschner, D.H., M. Hareuveni, I. Tsarfaty, N. Smorodinsky, J. Horev, J. Zaretsky, P. Kotes, M. Weiss, R. Lathe, A. Dion, en I. Keydar. 1990. Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms. *Eur. J. Bioch.* 189 : 463.

Xiang, J., J. Roder, en N. Hozums. 1990. Production of murine V-human Cr1 chimeric anti-TAG72 antibody using V region cDNA amplified by PCR. *Molecular Immunology* 27 N°8 : 809.

Xiang, J., J. Roder, Z.G. Pan, C. Roifman, en N. Hozumi. 1991. Modification in framework region 1 results in a decreased affinity of chimeric anti-TAG72 antibody. *Mol. Immunol.* 28 : 141.

Xiang, J. en Z. Chen. 1992. Genetic engineering of high affinity anti-human colorectal tumour mouse/human chimeric antibody. *Immunology* 75 : 209.

Yokota, T., D.E. Milenic, M. Whitlow, en J. Schlom. 1992. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Research* 52 : 3402.

Yuan, D., F.J. Hendler, en E.S. Vitetta. 1982. Characterization of a monoclonal antibody reactive with a subset of human breast tumors. *J.Natl. Cancer Inst.* 68 : 719.

Curriculum Vitae

De auteur van deze thesis werd geboren op 6 november 1966 te Keulen (Duitsland). Na haar kandidatuur Biologische Wetenschappen aan het Limburgs Universitair Centrum te Diepenbeek behaalde ze in 1989 haar diploma licentiaat in de Biologische Wetenschappen richting Fysiologie-Biochemie aan de Rijks Universiteit te Gent.

Van augustus 1989 tot mei 1990 verrichtte ze vrijwillig onderzoekswerk aan het Dr. L. Willems Instituut ter voorbereiding van haar doctoraatsthesis. Vervolgens werd ze gefinancierd door het Limburgs Kankerfonds en van oktober 1990 tot september 1993 werkte ze met een studiebeurs van het Belgisch Werk tegen Kanker aan het Limburgs Universitair Centrum en het Dr. L. Willems Instituut.

