

## ביוטכנולוגיה מולקולארית מתקדמת

### מבוא.

בקורס זה נעסוק בנושאים העיקריים העוסקים באדם בעיקר בתרופות מבוססות על הגנים ושימוש בגנים לפיתוח מוצרים לתועלת בני האדם מזה נגזר הנושא ל – Gene Therapy. הנושא השלישי הוא Drug Discovery בשיטות ביולוגיה קומבינטורית. נושא נוסף הוא הנדסת חלבונים לשיפור פעולת של חלבונים שנוצרו בטבע או שאנו יצרנו בזה נעזרים במודלים סטרוקטוראליים או במבנים של חלבונים קיומיים. והנושא האחרון הוא שימוש במערכת בגוף לטובתנו לדוגמה שיפור מערכת החיסון וכו'.

הביוטכנולוגיה ידועה כבר כ – 90 שנה באותה תקופה זה היה שם של תהליכים ביולוגיים שבוצעו בקנה מידה גדול כמו גידול חיידקים יצור יין וכו'. גילוי האנטיביוטיקות החל מביוטכנולוגיה אך עוצמתם הגיעה לאחר שהתגלה ה – DNA ומביניהם פענוח הקוד הגנטי. ההנדסה הגנטית נתנה את המהפכה. בתחילת שנות ה – 70 החלו לבטא גנים של יצורים מסוימים במערכות אחרות לאחר מכן השתמשו בכך לייצור אינסולין.

החברה הראשונה שנכנסה לתחום זה היא Gene Tech. לאחר מכן החלו לנסות למצוא מה הם כל הגנים של כל היצורים ובמקביל לגילוי קשר בין מבנה גנטי למחלות או הוכנסה ה – PCR. אנו עדיין לא יודעים את התפקיד של מרבית החלבונים בגופנו (כ – 2/3). מולקולאריות, מיקרוביולוגיה, ביוכימיה, גנטיקה, הנדסה כימית וביולוגיה של התא ביחד יוצרים ביוטכנולוגיה מולקולארית. את זה ניתן לנצל לשיפור יכולים לפיתוח זנים חדשים של יכולים תרופות חיסונים אבחון ומשק החי. בביוטכנולוגיה של יכולים יש הישגים הגדולים יותר בגלל שבשאר התחומים צריך אישורים רבים. ולוקח 10-15 שנים לפתח מוצר כזה.

אנו לוקחים DNA ממנו מבודדים את הגן מכניסים לפלסמיד מכניסים לתא מאכסן שם יכולה להיות אינטגרציה והתא המאכסן מתחיל ליצור את החלבון. Urokinas זה אנזים שהתגלה בשנת 1975 והוא עוזר בפרוק קרישי דם. אנזים אנלוג שלו הוא TPA אך הוא יותר ספציפי. גן זה (TPA) עבר שיבוט והפסיקו להשתמש ב – Urokinas.

נוגדנים מונוקלונליים פותחו לראשונה ב – 1975 ואז הם נחשבו ככדור קסם שהספציפיות שלהם כל כך גבוהה שניתן להשתמש בה לכוון תרופות ולרפא מחלות. אך זה לא כך והמולקולה הראשונה ששימשה כתרופה כזו אושרה ב – 1997 לאחר שהמולקולה הראשונה אושרה שאר המולקולות אושרו בקצב מהיר יותר. כיום יש בין 200-500 נוגדים כאלו שהם בשלבים של ניסויים קלונים לפני הכנסתם לשוק. אותו דבר גם בתרפיה גנטית.

שיטת הגילוי אלייזה היא בעזרת נוגדנים מונוקלונליים מסומנים. בה משתמשים לגילויים שונים כמו בדיקות הריון וכו'. כאן פותח הנוגדן לדיאגנוסטיקה וזה מהיר יותר. וקיימים כאלו יש כבר משנות ה – 80. אם לאדם יש מחלה גנטית ניתן לגלות זאת היום במצב המולקולארי למשל באישה בהריון בשבוע ה – 10 ניתן להוציא תאי שליה ולבדוק בבדיקות גנטיות שיגידו לנו מה הסיכוי שהעובר יכיל גן פגום מההורים. מששערים כי בעוד 10 שנים יהיו תעודות זיהוי גנטי והתרופות יהיו "תפורות" לפי הגנום האישי מה שנקרא פרמקוגנטיק. כיום ניתן למצוא מוטציה ב – DNA ברמה של נוקליאוטיד בודד וזה על ידי DNA ופריימרים המסומנים בסמנים שונים ביוטין באחד וגידוטיין בשני.

ב – PCR נוצר Mismatch אנו חוזרים דרך הביוטין ל – SA על פלטה כשיש קישור רואים את ה – D אך במוטנטי לא רואים את ה – D כי אין חיבור (ליגציה) בגלל ה – Mismatch. בשלב הזה משתמשים בנוגדן ל – D שנותן ריאקציה צבע זה ייתן צבע בנורמאלי וחוסר צבע במוטנט. חייבת להיות ביקורת של דוגמה חיובית לוודא שכל השלבים בדיאגנוזה עובדים. היום משתמשים ב – PCR לבדיקות לרמת המוטציה על ידי פריימרים ספציפיים וריאקציה PCR. כך שהאזור המקודד על ידי הפריימר יש שרשרת של אתרים שמקודדים לאנזימי רסטרקציה ועקב המוטציה מספר האתרים לאותו אנזים רסטרקציה

משתנה. ואז בהרכבה מזל ניתן לראות את הפטרן לשיטה זו קוראים RFLP וכך ניתן לקבוע גנוטיפ למחלה. כיום RFLP משמש לחיי יום יום גם לזיהוי פלילי וכו'.

ספריות היא גם שיטה לסרוק גנים בקורס זה נעסוק בספריות פפטידים ספריות ריקומבינציה וספריות רקומבינטוריות. מה – mRNA ניתן לסנתז את ה – cDNA ולראות הבדלים בין מצבי סימולציה למצבי חוסר סימולציה מאלו שהם ההבדלים מכינים פרוב על ידי אמפליפיקציה שלו ב – PCR ואז שימוש ב – Blot ומציאת הגן כשזה בין התאים עם הסטימולציה לאלו שהם ללא הסטימולציה.

כיום יש EST שהוא Data Base בו ללוקחים רקמה שלמה ומכינים ממנה את mRNA שזה אוסף כל הטרנסקריפטים שיביאו ליצירת חלבונים את ה – mRNA הוזה הופכים ל – cDNA חותכים באנזימי רסטריקציה ומכניסים לווקטורים עם Tag מסוים. הגנים יכולים להתקבל חתוכים ואז ניתן לקבל את הגן השלם לפי החולה וסוף כלומר, ה – ORF (מסגרת הקריאה הפתוחה) כיום רוב ה – EST מכילים את הגן השלם. מאגר נתונים זה פתר את כל בעיות ה – Cloning הוא מחולק לפי ממחלות וסוגי רקמה בגלל גודלו.

כיום ניתן לסנתז DNA בצורה כימית או יכולים לסנתז אוליגו נוקליאוטידים לשם בידוד גן או סנתוז של גנים קטנים. כיום ניתן לבצע גם ריאקציות לקביעת רצף בצורה אוטומטית על ידי סימון פלורצנטי של הבסיסים כל בסיס בצבע שונה. כיום גם בזכות ריאקציה ה – PCR ניתן לבצע הגברה מפיקוגרם (pg) למיקרוגרמים ( $\mu\text{g}$ ). או יכולים לא רק לזהות את ה – DNA אלא לבצע בו גם מניפולציות על ידי M13 או PCR יצירת Degenerate שזה נותן לשים בנקודה מסוימת יותר מבסיס אחד או מוטציה אקראית כל אלו נקראות Directed Mutagenesis.

לאחר שיש לנו כבר את הגן שלנו צריך ליצרו ולבטאו במערכות הטרולוגיות שזה תאי חיידקים פרוקאריטים, תאי שמרים תאי חרקים (שם יש אשרות למודיפיקציות) או בתאי יונקים. או חייבים לבדוק שהחלבון הרקומביננטי דומה לחלבון הנטיבי ולכן חייבים לאפשר ביצוע מודיפיקציות. על הגן צריך לשלוט כדי לדעת מתי הוא מבטא, היכן יבטא ומה תהיה מידת הביטוי שלו. דבר זה חשוב במיוחד ב – Gene Therapy.

כיום ניתן גם ליצור חלבונים כימרות Fusion Proteins. ניתן ליצר גם ביטוי מסנכרון של גנים שונים. כמו כן ניתן להגביר את יציבות החלבון על ידי הורדת אפשרות החתיכה שלו על ידי פרוטאזות. או גם יכולים לגרום לפלסמיד לעבור אינטגרציה לגנום התא ובכך להפוך לחלק בלתי הפרד ממנו. או יכולים גם להוסיף אלמנטים שיגבירו הפרשה של החלבון הרקומביננטי.

### נוגדנים והצגת חלבונים.

נוגדים הם מולקולות שידועות התכונות הביולוגיות שלהם ובעזרת זה הם יכולים לשמש לתרופות כי בעזרתם הגוף מגן מגורמים חיצוניים. הנוגדן מיוצר מתאי B המתמינים לתאי פלזמה המפרישים נוגדנים. בתהליכי ההבשלה הללו יש מערכות של ביטוי גנים ו – Rearrangement כלומר, סידור מחדש של גנים. תאי T Helper הם מפרישים כתוצאה מחשיפה לאנטיגן חומרים הנקראים ציטוקינים שתומכים בהתמינות תאי B לתאי פלזמה.

בתאי B יש מצב של Pro B שבו יש את האינפורמציה הגנטית של כל הנוגדנים הקיימים. לאחר ההכרה לאנטיגן, נקבל רק נוגדן מסוג אחד שהיה מופרש מתאים B מסוימים. יתכן שנגד אנטיגן מסוים היו מספר סוגי נוגדנים שונים. הנוגדן מורכב משני שרשראות קלות ו – 2 כבדות. בשרשרת הקלה והכבדה מפרידים באופן גס בין שני אזורים: אזורים וירבילים הקושרים אנטיגן ואזורים קבועים בהם השונות קטנה בין הנוגדנים מהמשפחות השונות.

כל נוגדן יודע להיקשר לאנטיגן ספציפי לפי החלק הוירבילי. יש 2 טיפוסים של שרשראות קלות  $\lambda$ ,  $\kappa$  ובשרשרת הכבדה יש  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  או  $\epsilon$  וכל אחד שייך לנוגדנים בעלי פונקציה פיזיולוגית שונה. האזור הקבוע של הנוגדן הוא בעל אתרי קישור לרצפטורים שונים הגורמים להפעלת תאים שמסיעים למערכת

החיסון לחיסול האנטיגן. לדוגמה ה-FC רצפטור הנמצא על בלענים וגורם לגיוסם כך שיבלעו נגיפים שעליהם קשורים נוגדנים. כמו כן יש כאלו שמפעילים את מערכת המשלים. בנוגדן ביצירת השרשרת הגן מורכב מאקסונים ואינטרונים וכך נוצר כמו גן רגיל בשרשרת.

באזור הוירבילי יש אזורים יותר וירביליים ואזורים פחות וירבילים ואלו שהם היותר וירבילים אחראים לקישור לאנטיגן. והפחות וירבילים הם המסגרת Frameworks. מבחינת חיבור ליצירת הדומיין יש אזור של V ואזור של חיבור J שבו מידת השינוי הגדולה ביותר. בשרשרת הגדולה יש גם אזור של D בין V ל-J. בנוסף לכך לאחר שתא B עבר את כל תהליך הסידור והפך לתא בוגר יש אלמנט נוסף של וירביליות והוא מוטציות סומאטיות זה גורם לשינוי בעיקר של האפיניות.

בתא ה-B הבוגר רק אחד מהאזורים הקבועים מתבטא כלומר, רק גן אחד של C (כלומר,  $\alpha, \delta, \gamma, \mu$  א ו  $\epsilon$ ). את הנוגדן ניתן לחלק לשני אזורים עיקריים בעלי פונקציות ביולוגיות שונות הזרועות שונות נוגדן ביולוגי והם בנויות מהשרשרת הקלה והכבדה. האזור השני הוא הגזע. השרשראות מחוברות בקשרים די סולפידיים באזור ה-Hinge והוא מאפשר את גמישות המולקולה. הלופים ההיפר וירבילים (כ-3 במספר) יוצרים את האתר הקישור לאנטיגן.

כשמסתכלים על נוגדנים במבנה של הלופים או מתקלים במשפחה גדולה של Ig like Domain, שהם ברובם קולטנים על פני תאים המכילים לופים הדומים לאימונוגלובולינים והם קשורים בפעילויות ביולוגיות רבות. הנוגדן נוצר כך שיש מעין פיגום ועליו נוצר פפטיד עגול בעל יכולת של הכרה. על השלד הזה ניתן לבנות ספריה פפטידית על ידי בניה בצורה רנדומאלית ולדוג רק את אלו בעלי פעילות הכרה ספציפית.

במערכת החיסון יש אלמנט מאד קריטי הוא שהרצפטורים שמפעילים את המערכת הם דומים במבנה הסטרקטורלי אך הבדלי הרצף גדולים. מה שאומר לנו שהטבע יצר לנו מערכת של מולקולות בעלי רצף שונה ומבנה דומה ולפעמים הפונקציה נקבעת על סמך המבנה ולא הרצף ולכן זה חשוב.

ה-CDR's בנוגדנים יכולים ליצור אינטגרציה עם הפטנים שהם אנטיגנים קטנים מאד שיכולים להיכנס לתוך האתר הפעיל. מולקולות גדולות יותר הם של פפטידים ועדיין יכולה להיות קשירה ל-CDR's הנוגדן בחלבונים גדולים. הנוגדן קשור רק לחלק קטן ומכאן על החלבון יכולים להיות הרבה אפיטופים (אתרים הקשורים לנוגדן).

תכונות הנוגדן שדברנו עליהם של שלד עם לופים והעובדה שמולקולות הנוגדן מורכבת מאזורים בעלי פעילות מוגדרת היה ניתן לגרום לכך שכיום ניתן להשתמש בחלקי מולקולות בעלי פעילות ביולוגית. אם אנו רוצים להשתמש בנוגדן כמכוון של תרופה לתאים מסוימים או גורם כזה אנו לא צריכים את כל החלקים בנוגדן. רק את ה-Fab או רק את ה-CDR's. כשאנו אומרים Fab אנו מדברים על יחידה אחת כאשר אנו אומרים  $(Fab')_2$  אז יש את שני הראשים עם חלק מהציר.

אין שום קשר שמחבר את האזורים הוירבילים של שני השרשראות לפעמים יש ביניהם קשר חזק מספיק שיחזיק אותם בלי קשר. זה נקרא Fv. אך זה לא תמיד נשאר כך ולנו פיתחו שתי שיטות לחברם אחד עם קשר די-סולפידי הקשר נמצא בקצה באזור שמור Frameworks מה שנקרא dSFv. אפשרות שנייה היא על ידי רצף של  $(GGGS)_{3-5}$  המקשרים בין היחידות. הגליצין היא גמישה והסרין עוזר למסיסות והוא מספיק גמיש להחזיק את המולקולה והוא לא מפריע ל-CDR's וזה נקרא scFv.

הטכנולוגיה של נוגדנים מונקלונלים מאפשרת לנו ליצור נוגדנים נגד גורם ספציפי על ידי איחוי תאי B עם מילומה לקבלת היברידיזומה. יכולת החדירה משתנה בשינויים שאנו יוצרים על הנוגדנים. כשמקטינים את גודלו מהירות החדירה עולה. אם אנו מזריקים נוגדן עכברי לאדם נוצרת נגדו תגובה אימונית על אף ההומולוגיה. ככל שנסיר יותר חלקים קבועים מהנוגדן תהיה פחות תגובה אימונית נגדו. הנוגדן מתביית לרקמה הספציפית והוא מתעכב פחות ברקמות לא ספציפיות. הדבר חשוב בצביעה רדיואקטיבית. כיוון שאם הוא היה יוצא לאט ונשאר זמן רב ברקמה לא ספציפית לא היה ניתן לקבל מדידה נכונה כי הרעש היה גדול מידי.

התגלה של CDR – יש את הוירבליות הרבה והקישור המקסימאלי עקב הוירבליות נמצא ב – CDR3. האתר ב – dsFv הוא אתר שמור המצוי בחלק התחתון של החלקיק ולא באמצע. ב – Fab אנו שומרים גם על אזור קבוע של שרשרת קלה ואזור קבוע של שרשרת כבדה. ניתן ליצור Diabody שמכיל שני אתרים אפילו שונים ועוד קומבינציות שונות. היתרון של מולקולות אלו הוא בראש ובראשונה הגודל הקטן שלהם המגדיל את מידת החדירות אך גם הוא מנוקה מהר מידי מהדם.

כיום יש מיקרים ש – scFv קטן מידי ולכן חוזרים לעבוד עם Fab כי הם כנראה היעילים ביותר. נוגדנים יוצרים מחיה שחיסנו אותה. מבודדים את תאי ה – B מאחים עם מילומה ומקבלים היברידומה המייצרת נוגדנים מונוקלונלים. כך שכל אלו מתא אחד יצרו רק נוגדן אחד המכיר אפיטופ ספציפי. השיטה של היברידומה מוגבלת כי יכולת הסריקה של ההיברידומות מוגבלת וכשמדובר על נוגדנים נדירים צריך שיטה אחרת.

עם הזמן ניסו לבנות ספריה קומבינטורית שתאפשר לנו ליצור נוגדנים נגד כל מיני דברים. הראו כי אפשר לקחת עכברים לבצע להם נוקאאוט ללוקוס של הנוגדנים מסוג IgG וששותלים לו באמצעות קבוצות גדולות של גנים. הם לקחו תאי גזע עוברים של עכבר שעבר נוקאאוט ללוקוס IgG ושתלו לו לוקוס אנושי ל – IgG בעזרת YAC'S וגם לשרשרת הקלה ואחר סידרה של הכלאות יצרו עכבר טראנסגני Xenomouse שכאשר מחסנים אותו אז הנוגדנים IgG שהוא יוצר הם נוגדנים הומאניים.

גם בשיטה זו אנו מוגבלים כי גם כאן אנו צריכים לחסנו לבודד תאי B ליצור היברידומות (שיבצרו כי מדובר בתאי עכבר ולא אדם) והם יצרו נוגדנים מונוקלונלים של אדם. כיום כבר יש ספריות המכילות את כל הרפרטואר החיסוני ומהם ניתן להפיק איזה סוג נוגדנים שרוצים. אם יש לנו נוגדנים ואנו מעוניינים רק באזור הקישור אז ניתן ליצור ספריות של האזור הוירבלי כמו scFv, או קצת יותר גדול ספריות של Fab. בשביל זה צריך לדעת קודם כל רצף. לאחר מכן צריך להכין מערכות יעילות לבניית scFv שקושרים את האזורים הוירבלים של השרשרת הקלה לחוד והכבדה לחוד וגם את הלינקר.

בספרית Fab אין את בעיית הלינקר אך יש בעיית שיבוט שצריך לשבט שתי שרשראות כדי שהיידק יצור את הקשר הדי-סולפדי. אנו ניקח את אוסף ה – DNA ונשבט אותו לוקטור ואז צריך לבטאו באיזה שהיא צורה. ניתן לבצע זאת בספרית ביטוי. אנחנו צריכים קשר בין המקודד לביטוי הנוגדנים. ב – 1985 לקחו פאג' פילמנטי שיש על שטח הפנים שלו מספר חלבונים האחד הוא תוצר של Gene3 והשני הוא תוצר של Gene8.

ה – Gene3 נקרא Major Code Protein וה – Gene8 נקרא Mainer Code Protein. הפאג' הוא וירוס של חיידקים והפאג' הפילמנטי נכנס דרך הפיל ומשחרר את ה – DNA שלו לתוך החיידק ואז הרעיון היה שאם נציג על פני שטח הפנים של הפאג' את הנוגדן אז ניצר את הקישור הרצוי בין הרצף המקודד לביטוי הנוגדן. וכיוון שהפאג'ים מבצעים רפליקציה אז נקבל תוצרים רבים. אם נוסיף רצף רנדומאלי המקודד ל – 10 חומצות אמינו לגן שמקודד ל – Gene8 כך נקבל ספריה של כל האפשרויות כלומר,  $20^{10}$  (20 חומצות אמינו שוות 10 מקומות).

לתא המאכסן היה אוסף אדיר של קומבינציות פפטידים המאוחים ל – Gene8 כך שכל פרט בחיידק בגנום שלו יש קומבינציה אחת. כל פאג' מציג על פני שטח הפנים שלו פרוטאין 8 שעליו מאוחה הרצף. אם ניקח  $10^8$  חיידקים וכל חיידק יוצר 100 פאג'ים כך נקבל  $10^{10}$  פאג'ים שכל אחד מהם מכיל חלבון 8 שלו יש רצף פפטיד וההבדל בין הפפטידים זה הרצף הזה. על פי עקרון זה ניתן להכניס רצף גנים וליצור Phage Display כיוון שהפאג' מייצג על פני שטח הפנים שלו חלבון כזה.

כך ניתן להוסיף רצף של scFv ואז לקבל צבר של נוגדן. כנ"ל גם ניתן לבצע עם Gene3. את הפאג'ים הללו ניתן לסרוק עם אנטיגן, לקבלת הפאג' עם הנוגדן הרצוי. וכך גם יש קשר פיזי ישיר בין הגנוטיפ לפנוטיפ, כי בפאג' יש את הרצף בגנים של מה שהנוגדן קולט. בנוסף יש גם מצב במחזור הראשון, הסיכוי למצוא את המולקולות הכי אפיניות הוא נמוך ולכן צריך לעשות הגברה לאלו שהתקבלו ולסרוק ששוב

לזה קוראים פנינג. והפאג'ים משכפלים את עצמם בכמות תוך חיידקים ולכן יש לכך יתרון גדול, כי לא צריך מנגנון הגברה. בכל סיבוב תהיה העשרה כך שכמות הפאג'ים הספציפיים ביותר תגדל. ב-3 סיבובי העשרה כאלו ניתן לדוג מולקולה 1 מתוך  $10^8$  בעוד שבהירידומות צריך לסרוק  $10^8$  הירידומות. הפאג' משמש רק לנשיאת הנוגדן.

העיקרון פשוט כי אינפורמציות הגנטית לנוגדנים ידועות אז משתמשים בפריימרים לסנתזת ב-PCR של אזורים וירבלים של שתי שרשראות. אם אנו רוצים ליצור ספריה נאיבית שלא עברה מיון אז ניקח לימפוציטים מהפריפריה את ה-mRNA המכיל את כל המידע וממנו מכינים cDNA אותו מחברים לקונסטרוקט (מבנה) של scFv בעזרת PCR השלב הבא הוא שלב הליגציה עם אתרי רסטריקציה מתאמת לתוך וקטור המכיל את הגן 3 (כשמבטאים scFv) אז יש וקטור המקודד לפאג' הרקומביננטי כך מקבלים רפרטואר של sc. צוואר הבקבוק הוא החדרת הספרייה לתוך המאכסן היכולת הזאת מוגבלת גם הליגציה מוגבלת ביעילותה. הריקומבינציה נעשית בצורה רנדומאלית ב-PCR כך שאנו שמים 2/3 מהלינקר על כל V ו-J וכך יכולים להיות כל הריקומבינציות.

אנו מוסיפים tag כדי שנוכל לזהות את ה-sc ואחריו יש Amber לעצירה. אלו פאג'ים ליזוגניים אך גם הם יוצרים פלאקים. ולכן צריך ליצור פאג'מיד שהוא פאג' שהוא גם וקטור (פלסמיד) וכך ניתן לגדלם בחיידקים בלי פלאקים. זאת על ידי הוספת Ori של חיידק לפאג' או תוספת Ori של פאג' לחיידק. כך מקבלים ויריונים המציגים scFv מהחיידקים ללא פלאקים. כלומר, מקבלים מושבות של פאג'ים. על הפלסמיד יש גם עמידות לאנטיביוטיקה. כדי לקבל את הויריונים נקיים אנו משתמשים במנגנון נוסף לסיפוק הגנים החסרים כדי לקבל פאג' מחודש. כדי לקבל את הפלאקים צריך להוסיף Helper Phage שמספקים את הגנים החסרים ואז הפאג'ים יוצאים החוצה.

אמרנו שניתן להציג חלבונים על שטח הפנים של פאג'ים אנו מדברים על פפטידים של 15-20 חומצות אמינו או על נוגדנים וזאת על ידי איחוי שלהם עם חלבון מעטפת. בעזרת הפאג'ים שמתקבלים ניתן לסרוק ספריה גדולה מאד בנוסף יש כאן אפשרות להעשרה כך שבסופו של דבר מקבלים את הפנוטיפ הכי יעיל למה שאנו רוצים (בנוגדן הפנוטיפ הוא הקשירה החזקה ביותר). ובעזרתו ניתן לחזור לגנוטיפ ולמצוא את הגן שאחראי לכך. העשרה מתקיימת עקב העובדה שהפאג'ים הם רפליקטיביים.

הוספת החלבון לפאג' אינה פוגעת ביכולת האינפקציה שלו. אנו משתמשים אם בגן 3 או בגן 8 שהם יוצרים חלבונים שמופעלים על שטח הפנים של התא.

אפיניות היא חוזק הקישור של הנוגדן לאנטיגן והאפיניות הזו נובעת משיתוף הפעולה של שני היחידות האפיניות של היחידה המונווולנטית זהה לזה של הביולנטי ברוב המקרים. אך האבידיות היא העובדה שיש בנוגדן שלם 2 אתרי קישור ובמונווולנטי יש רק אתר קישור אחד כלומר, מתייחסים כאן לכמה מולקולות יכולה המולקולה הזו לתפוס פר יחידת שטח (לא שטח הנוגדן אלא תא רקמה וכו'). לפעמים הליגנד גורם להגברת האבידיות ואגריגציה של רצפטורים וכך עובר הסיגנל לתא.

בעניין האבידיות אם יש לנו מולקולה עם אפיניות מאד טובה בנוגדן, אנו רוצים שלא יהיה האפקט של האבידיות כי אנו רוצים למצוא את האפיניות המקסימאלית ולא את הכוחות המשותפים של האבידיות והאפיניות יחד. לכן אנו דואגים שההצגה תהיה מונווולנטית (עושים זאת על גן 3). בפפטידים לעומת זאת המצב שונה כי אפיניות הפפטידים נמוכה בהרבה (בנוגדנים האפיניות גדולה ב-3 סדרי גודל מבפפטידים).

החוזק המינימאלי לקבלת קישורים ספציפיים הוא  $\mu\text{M}$  ולכן נציג על גן 8 כי אז היו אלפי עותקים על שטח פני התא וכך מחזקים את האבידיות ואז חוזק הקישור למטרה גדל. כך ניתן לבודדם ביתר קלות בשלב הראשון כך מסיגים מועמדים לשלב השני לזה קוראים לידס. בהם אנו משנים את העמדות הלא זהות (מוציאים אותם לאחור בדיקת רצף לכל הלידס) וכך מקבלים רצפים שונים של פפטידים שכולם מקשרים ובודקים מי נקשר הכי חזק. כשעובדים עם גן 3 ניתן ליצור הצגה מונווולנטית.

אנו משתמשים בפאג' ליזוגני המשתחרר החוצה מהתא כשהוא לא יכול לעשות זאת וכלי לגרום לו לליזיס. אנו משתמשים בפאג'מיד כדי שנוכל לעבוד במושבות ולא בפלאקים. אנו משתמשים בגן 3 או 8 שאליו מחוברים שאר הגנים. חלבוני המעטפת חסרים בפאג' זה, על כן משתמשים ב – Helper phase שמייצר את חלבוני המעטפת. כך מתקבלים בסוף פאג'ים רקומביננטים ארוזים שאיתם ניתן לבצע סריקה. על פאג' האריזה יש מרקר סלקטיבי השונה מזה שעל הפאג'מיד וכך ניתן לבצע סלקציה לחיידקים שמכילים את שני הוקטורים הללו.

אנו יכולים לגרום לביטויים ברמות שונות במספר שיטות והם: Type 3 שבו יוצרים את הפאג'ים כך שגן של הספרייה בקצה ה – N של הגן 3 ומבלים שכל חלבוני 3 יש את הפפטיד. Type 8 שהוא באותו עיקרון רק עם גן 8 ומקבלים Multy Display כלומר, כל חלבוני ה – 8 הם עם הפפטיד. Type 88 ו – Type 33 הם שיטות בהם אנו רוצים שיהיו מעט עותקים כלומר פחות מהמקסימום את זה עושים על ידי שני עותקים על הגן שני עותקים על גן אחד תקין ואחד רקומביננטי וכך מקבלים התוצרים. הדבר יוצר אפקט של מיהול (תחרות) וכך רוב הויריונים יוצאים שמתקבל תוצר ביניים רצוי.

שיטה זו לא כל כך יעילה כי בגלל סידור הפרומוטורים קשה לגרום לכך שיהיה שיעתוק שווה ותיגרם תחרות. כך מתקבלים יותר עותקים של החלבון המאוחד משרצינו. כלומר, במקום 5 רצינו 1 וקיבלנו 3 עד 4 בגן 3 ואילו בגן 8 במקום אלפים רצינו 10 וקיבלנו כמה מאות. לכן צריך לבנות מערכת פוליציסטרונית אך זה מסובך ולכן מצאו מערכות אחרות והם 3+3 או 8+8 בהם יש את הגן המאוחד לספרייה ועל הפאג'מיד יש גן לעמידות לאנטיביוטיקה ואז אנו מכניסים Helper Phase המספק עותק של WT של 3 או 8 בהתאמה. כלומר, לגנים השונים יש יחידות רפליקציה שונות כדי לגרום לכמות קטנה של הגן המאוחד. אנו נותנים פרומוטור יעיל יותר בפאג' העוזר או להוריד יעילות של הפרומוטור הרקומביננטי על ידי מוטציה קטנה בפרומוטור שלו וכך מקבלים מאזן שנותן כמות רצויה של חלבונים מציגים בין 0 ל – 1 עותקים בגן 3 ובערך 10 על גן 8. אנו מקבלים רק 10 עד 20 אחוז של פאג'ים רקומביננטים במערכת הזו אך זה מספיק.

האינפקטיביות של הפאג' מקודדת בחלבון מס' 3 ודרכו מתבצעת ההדבקה ולכן חשוב שהוספת הפפטיד לא תפגע בפעילות האינפקטיביות של הגן. את כל הויריונים המתקבלים שהם בעצם הספרייה אנו חושפים לאותו אנטיגן (חלבון מטרה, סוכר וכו') שאנו רוצים כאן הספציפיים נקשרים השאר לא. אנו שוטפים פעמים רבות וכך רק אלו שנקשרו עקב הפפטיד המוסף נשארים והשאר נופלים. אז מבצעים אילוציה לניתוק הקשר בין הפאג'ים לאנטיגן על ידי שוני pH, ריכוז מלח וכו'. עם הפאג'ים שהתקבלו אנו מדביקים תאים חדשים לקבלת אוסף חדש של ויריונים זוהי העשרה ושוב בודקים קשירה על זה חוזרים 3-4 פעמים ואז מקבלים ריכוז גבוה של הפפטיד הרצוי.

אם בהתחלה הפאג' הוא 1 ל – 10 מיליון אז לא נראה אותו כלל בשני הוא היה 500 בשלישי 500000 וכו'. כך ניתן ליצור נוגדנים נגד כל גורם זר שרוצים. על הפאג'ים הוצגו לראשונה פפטידים ורק 5 שנים לאחר מכן הצליחו ליישם רעיון ספריות הנוגדנים בשיטה זו וליצור את מה שנקרא Antibodies Bypassing Immunization שזה ליצור נוגדנים ללא חיסון. הקונספט של זה מראה ונותן יכולת לקחת מערכות קומבינטוריות גדולות כמו מערכת החיסון ולהציגה ללא צורך בבן אדם. כך שבמבחנה יהיה את כל הרפרטואר החיסוני שלנו. נוגדן שלם שלא ניתן להציג כי הוא גדול מידי אך ניתן להציג scFv וגם Fab.

דיברנו כבר על הכנת נוגדנים מונוקלונלים בעזרת מילומה או הפקת נוגדנים הומאניים על ידי עכבר טראנסגני הפאג'ים הם מחליפים את הצורך באדם ובעכבר ומאפשרים ליצור ספריית נוגדנים המוצגות על פאג'ים. אנו מחברים את ה – scFv לגן עם לינקר מהטחול אנו מפיקים את כל הרפרטואר של הגנים הויריבילים נחבר אותם ב – PCR ונאחה לגן 3. כך נקבל את ספריית הפאג'ים כך שכל פאג' מכיל רצף של scFv. כן יש את כל אוסף הגנים והמגבלה היחידה היא כמה חומר גנטי ניתן להכניס לתוך הפאג'מיד. וכך במעבדות פשוטות ניתן להכין ספריות של  $10^6$  עד  $10^7$  בקלות ומעבדות מתמחות אף יותר וכך אדם אחד יכול להשתמש במבחנה עם  $10^9$  פאג'ים שמכילים רפרטואר של  $10^6$  ועם מספר מחזורים של סלקציה תוך שבוע יש לו את הנוגדן הרצוי.

בין ה- scFv לגן 3 אנו שמים קודון ל- Stop שהוא Amber ואז אנו מגדלים בחיידקים עם סופרסון ל- Stop זה והם מכניסים חומצה אמינית (גלוטמיק אסיד) במקום לעצור בו. אם אנו רוצים הצגה על פאג' אנו משתמשים בחיידקים שעושים סופרסיה ואם אנו רוצים נוגדן מסיס אנו משתמשים בחיידקים שלא עושים סופרסיה.

כשאנו מדברים על ספריות נוגדנים יש כמה סוגי ספריות. אם המערכת מוגבלת לגודל הספרייה אנו לוקחים חיה (רצוי עכבר כי אנו יודעים 99% מהגנים בעכבר וקל להכין פריימרים). אנו משבטים את הרפרטואר הזה למערכת הפאג'ים ומספיק שתהיה ספרייה של  $10^6$  לקבלת נוגדנים טובים ואם החיסון טוב ניתן גם להשיג נוגדנים טובים מספריות קטנות יותר. נניח שאנו יודעים שחלבון הקשור למחלה ואז מפיעים נוגדנים ייחודיים אצל אותו אדם ואנו רוצים לבודד נוגדנים אלו.

הפטיס היא מחלה ויראלית שפועלת בכבד ואן מה שמונע אותה יש עליה של 20% בהידבקות כל שנה. מחלה זו היא הגורם מספר אחד לצורך בהשתלת כבד. כיום אין טיפול לכך והרעיון להכין לכך נוגדנים ביעילות גדולה נגד וירוס זה. לאנשים שנדבקים בוירוס יש נוגדנים באופן טבעי נגד הוירוס ואנו יכולים לבודד נוגדנים נגד חלבוני המעטפת של וירוסים אלו ואנו יוצרים חיסון טבעי וזה כמו להשתמש בספרייה מחוסנת לספרייה אלו קוראים Immunized Libraries.

סוג נוסף של ספריות הוא ספריות לא מחוסנות הם התגלו שראו שניתן להכין ספריות גדולות יותר כלומר, ספריות נאיביות. הרפרטואר הנאיבי הוא רפרטואר לאדם שלא חוסן. אנו לוקחים לימפוציטים מהאזור הפריפרי ומוציאים מהם DNA וזה מכיל את כל הרפרטואר החיסוני. כך הגיע לבערך  $10^{12}$  נוגדנים ברפרטואר לספריות האלו יש גם תת קבוצה של ספרית סמי-סינטטית שהם על ידי CDR's הנותן את הוירבלייות הכי רבה ואז אנו משבטים את כל הרפרטואר וכדי להגדיל את מידת השונות נבצע רנדומיזציה מכוונת בעזרת RCP על אזורים המיועדים למוטציה, כלומר, ה- CDRs ובעיקר CDR3. כך מקבלים רפרטואר נוסף מלבד לקיים. וכך מקבלים גן סינטטי.

ניתן לחפש גם את ה- Frameworks הכי שכיחים באוכלוסיה שנותנים את הנוגדנים הכי יציבים וגילו שיש 3-4 רצפים שניתן לקבעם בספרייה והם היו ה- Frameworks וביניהם נכניס את כל המקטעים המשתנים של ה- CDR's כקסטות המוכנסות על ידי חתיכה באנזימי רסטריקציה. ה- CDR's הללו הם אנושיים בתוספת רנדומיזציות המשנות את הרצפים והגודל שלהם וכך מקבלים ספרייה נאיבית + רצפים שהכנסנו בצורה של הנדסה גנטית.

היתרונות של המערכת הזו הם שהמקור של הנוגדנים יכול להיות מכל מקום לאחר שיבוט ה- DNA זמין למודיפיקציה נוספת וגם ניתן לסרוק רפרטוארים גדולים מאד. כמו כן ניתן לבצע סלקציה בשיטות שונות. לאחר הסלקציה מבצעים תהליך של Screen שבו מבודדים מושבות שכל מושבה נגזרת מחיידק אחד שבו יש פאג' אחד כך שהמושבה היא מונוקלונלית. ולכן הפאג' שמתקבל בסוף הוא מונוקלונלי. לאחר שמקבלים את הנוגדן ניתן לבדוק אותו בשיטות שונות ציטוכימיה, Western Blot, אלייזה ומבחנים ביולוגים נוספים.

ניתן להשתמש בנוגדנים כדי להנחות תרופות לכיוון מוטציה סרטנית. בגידול לאחר הוצאת רוב התאים הסרטניים ניתן לטפל בכימותרפיה (תרופות) או ברדיותרפיה (הקרנות) שגורמים לפעילות לטאלית והפסקת החלוקה. התרופות בטיפול הכימותרפי גורמות להפסקת החלוקה במספר צורות ביניהם הפרעה בהכפלת ה- DNA. בשנים האחרונות משתמשים בתאים ומולקולות של מערכת החיסון כדי להתקיף את התאים הסרטניים כשרוצים לתכנן מולקולות כאלו צריך להסתכל על הביולוגיה של התא הסרטני כלומר, השינויים שנגרמים בתפקודו ולמצוא את החלבונים המתבטאים על פני התאים הסרטניים שלא היו קודם או חלבונים שהפסיקו להיות מבוטאים על שטח הפנים או ביטוי של חלבונים מסוימים על שטח הפנים כעודף. ואנו מנסים להתביית על שינויים אלו כדי להתביית על התא הסרטני. לדוגמה אם יש תא סרטני ממקור אפידרמלי המכיל רצפטור לפקטור גידול ביתר ושכמות הרצפטור הזו עולה היא ניתנת לשימוש כמטרה להתבייתות.

משפחה נוספת הם אנטיגני דיפרנציאציה כך שבמשך התבגרות התא הוא עובר שלבי דיפרנציאציה שונים עד התבגרותו, בכל שלב יש גנים אחרים שמבוטאים על שטח פני התא. תא סרטני נוצר כתוצאה מפגיעה בדיפרנציאציה ומתקלות חלוקה בלתי מבוקרות ואז סמני הדיפרנציאציה של השלב הזה מבוטאים על התאים הסרטניים בעוד שהתאים הבוגרים מאותו קו תאים לא מבוטאים גנים אלו וכך ניתן להבדיל ביניהם. דוגמה לכך זה מלנומה.

קבוצה נוספת היא Oncofetal Proteins שהם חלבונים עובריים שלא מופיעים בבוגר אך הם מופיעים ומבוטאים שוב בתאים סרטניים חלקם מתבטאים גם על שטח פני התא. הקבוצה האחרונה היא Cancer (Tumor) Associated Antigens (TAA) (בקיזור TAA). הם פפטידים שמוצגים על MHC I והם מוצגים בתאים סרטניים עקב יצירתם בעודף בתא וכך הם מוצגים למערכת החיסון לאחר שהם עוברים דגדגה בתוך התא ומוצאים כפפטידים על MHC I. erbB2 הוא אונקוגן חשוב ל-EGF רצפטורים עליו נדבר בהמשך הוא דוגמה לטרנט (מטרה) אנטיגן. כל תאי הגליומה במוח המבטאים רצפטור מוטנטי mEGF-R הם מהווים מטרה עם גן ייחודי המשמש כמטרה אנטיגנית.

Lewis Y הוא שייר של סוכר הנמצא על חלבונים רבים בתאים סרטניים בעיקר קרצינומות. אחד האנזימים האחראיים לגליקוזילציה חסר ושרשרת הסוכר שונה ואז התאים הללו מבוטאים הרבה Lewis Y ולכן זה מהווה טרגט טוב לזיהוי. לאחר שיש מטרה צריך נוגדן. ניתן לבנות נוגדנים ערומים הגורמים בהיקשרותם הפרעה במנגנון הפרוליפרציה שלו אותם רצפטורים שהם בעלי תפקיד קריטי להתקיימותם של תאים אלו.

נוגדנים אלו לא רק שיכולים לגרום להפרעה בהעברה של האות אלא גם להכנסת סיגנל למוות. אך במציאות זה לא בדיוק כך כי יתכן שהטרנט לא מספיק חיוני והתא בונה מנגנון אחר או שהוא לא כל כך ספציפי לסרטן. ה-EGF עובר ביטוי מוגבר בהרבה תאים סרטניים אנו אומרים שאם נחסום קישר של FGF לרצפטור אנו נפגע בסרטן. אך יש מספר רצפטורים ל-EGF וכל אחד קשר מספר רב של לליגנדים. ב-EGF יש 4 רצפטורים שונים ו-20 ליגנדים כך שאם היינו יוצרים משהו שמונע קשירת FGF אז ליגנדים אחרים יכלו להיקשר (לעתים קרובות יש אתרי קשור שונים על אותו רצפטור).

אפשרות שנייה היא ל"חמש" את הנוגדנים בזרוע אפקטורית שתיתן לו פעילות ציטוטוקסית על ידי קשירת טוקסינים לנוגדן. הטוקסינים יכולים להיות אותם תרופות שאנו משתמשים בהם בכימותרפיה לדוגמה דוקסירובוצין המתביית עם BMS ל-Lewis Y כך יש התבייתות על הסרטן וקטילתו בייעילות רבה יותר. ניתן לחבר לנוגדנים גם חומרים רדיואקטיביים בלי מרחק קרינה קטן מאד. וכך נפגעים רק תאים סרטניים. ניתן גם להשתמש בנוגדנים כאלו לדיאגנוסטיקה. למציאת גידולים סרטניים.

שיטה נוספת היא הכנת נוגדנים Bi-Specific שיש להם שתי ספציפיות כנגד שני אנטיגנים שונים למשל אחד נגד זה של התא הסרטני והשני קשור בהפעלת תאי T. ואז התא הסרטני מצופה בתאים אלו ותאי T הורגים מגיעים ומנסים לחסל את התא הזה.

שיטה נוספת היא Pro-Drug Therapy העיקרון הוא שלוקחים תרופה ציטוטוקסית לחולה היא נכנסת לתאים והורגת אותם אך כשאנו מכניסים תרופה אז היא לא ציטוטוקסית אך בהגעתה לגידול מורדת ממנה קבוצה מסוימת והיא הופכת להיות ציטוטוקסית והורגת את התא למשל דוקסירובוצין שהיא מאד טוקסית. ניתן ליצור נגזרת שלה שתהיה כלל לא ציטוטוקסית הקבוצה שאנו מוסיפים ניתנת לחתיכה. התרופה מסתובבת בגוף ומפוזרת בו באופן אקראי כולל גם באזור הגידול ואז עושים נוגדן המתביית על התא הסרטני ובנוסף יש עליו קבוצה נוספת שהיא אנזים המבקע את המודיפיקציה מהתרופה ומקבלים באזור הגידול בלבד מולקולה ציטוטוקסית. כדי שהאנזים לא יחתוך את התרופה בדרך אז נותנים קודם את הנוגדן עם האנזים ואז נותנים לנוגדן לעבור כלירנס (התנקות מהאזורים בגוף אליהם הנוגדן לא נקשר) ורק אז נותנים את התרופה. כך רק באזור של הגידול היה את האנזים. הבעיה של נגישות של הנוגדן והאנזים ולכן משתמשים ב-scFv.

אימונוטוקסינים – הרעיון הוא שהייתה ידועה קבוצה של רעלים (טוקסינים) שהם ממקור צמחי או בקטריאלי בחיידקים אלימים במיוחד. לדוגמה מפסאודומונוס שהוא חיידק אלים הגורם לדלקת ריאות



אלימה מאד. החלבון שהוא מפריש מורכב משלושה Domains בשקף הירוק הוא הנקשר לתאים לרצפטור  $\beta$ -Microglobulin תת היחידה הצהובה גורמת לרטרוגרדיי טרנספורד כלומר, לעבור מה – ER לציטוזול או במילים אחרות טראנסלוקציה בכיוון ההפוך ותת היחידה האדומה הנקראת ADP Ribosilation שהיא בעלת פעילות אנזימטית העושה ADP ריבוזילציה ל – Elongation Factor 2 ובכך הוא מפסיק לחלוטין את סינתזה של החלבונים בתא כתוצאה מכך התא עובר אפופטוזיס ומת. ל – Elongation Factor 2 (EF2) יש היסטידין באתר הפעיל וה – ADP Ribosilation גורמת להשבתת אתר זה. הפוטנטיות כאן גבוהה כך שמספיקה מולקולה אחת של טוקסין שתיכנס לתא כדי שהתא יושבת לחלוטין.

החלבון הזה נכנס לתא דרך Coated Pits לתוך וסיקולות ומשם לאנדוזומים שם עקב החומציות נחתך הקשר הדי-סולפידי אז תת היחידה האנזימטית עם חלק מה – Translocation Domain מגיעה ל – ER על ידי איחוי ממבראות ושם היא תקועה ואז ה – Translocation Domain יוצר תעלה ומאפשר יציאה של המולקולה לציטוזול שם היא פועלת על EF2 ומשביתה את התא. את ה – Translocation Domain יחד עם החלק הקטליטי של החלבון הזה ניתן לחבר לנוגדן scFv ומקבלים scFv Immunotoxin.

כיוון שכל Domain מתקפל באופן עצמאי אז לקיחת חלק ממנו לא משנה את המבנה המרחבי ולא מאבדים את הפעילות הביולוגית (בתנאי שניקח Domain שלם). ברגע שהטוקסין ניכנס פנימה דרך רצפטור העובר אינטרנליזציה כלומר, נכנס פנימה וכך הנוגדן בעצם מחקה את פעולות הליגנד הטבעי. כשהטוקסין ניכנס הוא מגיע לאנדוזום ומשם ל – ER ואז הוא עובר ביקוע ומקבלים את המולקולה האקטיבית כמו בטוקסין הטבעי. אך כאן בעזרת הנוגדן יש הכוונה ספציפית לתא הסרטני.

לפעמים צריך להוריד את האפיניות של הנוגדן כי על התאים הסרטניים יש כמות אדירה של רצפטורים וכך על ידי הקטנה של האפיניות לא נקשרו כלל נוגדנים לתאים בריאים אך לסרטניים נקשרו עדיין רבים. בעבר זה נעשה עם נוגדנים שלמים והם גדולים ופחות עבירים ולכן זה פחות יעיל בנוסף גם היה קונוגציה כימית שהייתה במקומות שונים וכך פעילות שונה בדור השני בעזרת scFv או dsFv הדבר שיפר את היעילות בצורה משמעותית.

הגודל של scFv הוא האופטימאלי לשמירה בגוף מספיק זמן ללפני שהכליות מנקות אותו מהגוף וזמן זה מספיק כדי להתביית על הגידול ומולקולות קטנות יותר מסתננות לפעמים לפני שהן מאתרות את התאים הסרטניים. כלומר רוצים Optimal – Blood : Target Ratio. ניתן ליצור מבנה דומה לנוגדן על ידי שני dsFv המחברים לטוקסין או מקבלים חוזק קישור גדול יותר.

הרספטין היא מולקולה המבוססת על נוגדן מונוקלונלי שיש לו אפקט ינהיבטורי (הגברה). בסרטן שד ה – EGFR2 הידוע גם בשם HER2 הוא אונקוגן המעורב בגדילה בלתי מבוקרת של התאים הנובעת מכך שרצפטור זה מתבטא בעודף על שטח פי התא ואז בא ליגנד (לא ידוע עד היום, מאמינים שהליגנד הוא שייך למשפחה של ה – EGF) בתא הסרטני יש אמפליפיקציה על הגן ל – HER2 גורם לחשיפת יתר לליגנד עקב דופליקציה של הגן למספר רב של עותקים. הדבר גורם לכן שה – HER2 תמיד אקטיבי הוא שייך למשפחת הרצפטורים של טירוזין קינאזות. כתוצאה מכך יש אירועים של Signal Transduction ובסוף מגיעים לגרעין שם מופעלים פקטורי שיעתוק וסיגנל לחלוקת התא.

הליגנד נקשר רק כשהרצפטור בצורת דימר כלומר, ששני רצפטורים מספיק קרובים ליצור דימר הרצפטור השני יכול להיות HER2 ואז מקבלים הומודימרים או HER1,3,4 ואז זה הטרודימר. בתאים נורמאליים יש עותק אחד של הגן הזה ולכן כמות הרצפטורים קטנה יותר ואז הסיכוי ליצירת דימרים קטן יחסית. בתאים סרטניים בגלל ביטוי היתר הסיכוי ליצירת דימרים כאלו גדול יותר. הגן הזה הוא גן אונקוגן. הדבר קורה ב – 30% של גידולים מטסטטים בקרצינומות סרטן השד. גילו כי מידת התוקפנות תלויה בכמות ה – HER2 כלומר שיש יותר HER2 התא יותר תוקפני.

הנוגדנים הראשונים בהם השתמשו הם נוגדנים ערומים כלומר, ללא תוספות וכך הם פועלים לפי החלק האפקטורי שלהם ה – FC בנוגדן מכוון להפעלת פעילות ביולוגית של תאי מערכת החיסון נגד האנטיגן.

אפשרות שנייה היא שהפעילות האפקטורית הזו לא מענינת אותנו כיוון שהנוגדן גורם לשוני באנטיגן את זה החלו לבצע שראו כי הנוגדן יכול לחקות ליגנד.

מולקולות עזר Accessory Molecules הם מולקולות המסייעות כמו CD3 שעוזרת להעברת הסיגנל בין ה-MHC ל-T Cell רצפטור. במעבר הסיגנל פנימה מופעלים שליחים משניים בקסקיד עד ההגעה לגרעין (פרוליפרציה של תאי T). הראו שנוגדן מונוקלונלי שמכוון כנגד CD3 יכול לחקות את הליגנד הטבעי ולהפעיל את T ומכאן ראו כי הנוגדן יכול לחקות פעילות של ליגנדים. דוגמה נוספת היא ה-Fas – Fas וה-Fas ליגנד. מה שגורם בתאים מסוימים לאפופטוזיס. על סמך זאת הניחו שאם יש מולקולה על שטח פני התא הקשורה במעבר סיגנל אז ניתן להפעילה על ידי נוגדן.

כיוון נוסף הוא ההפך כלומר, הפסקת פעולה של ליגנד על ידי נוגדן שמונע קשירה של הליגנד לרצפטור. ההרספטיין הוא נוגדן המכוון נגד HER2 שהוא רצפטור שהוא גם אונקוגן אמפליפיקציה של גן זה קשורה באופן ישיר בגידולים ובסרטן. האמפליפיקציה של HER2 תלויה גם בפרוגנוזה גרועה כלומר, ככל שיש יותר HER2 המחלה אגרסיבית יותר. ה-HER2 הוא חלבון טרנס-ממבראנלי בעל חלק מחוץ לתא חלק טרנס-ממבראנלי וחלק בתוך התא. החלק הפנימי הוא בעל פעילות של טירוזין קינאז.

המיוחד ברצפטור זה וברצפטורים לגורמי גדילה ממשפחת ה-EGF הוא שיש צורך בליצור דימר. רוב האינדיקציות מראות כי הדימריזציה הכרחית לשינוי הקונפורמציה להפעלת אזור הקינאז וגם קישור הליגנד כלומר הליגנד יכול להיקשר רק כשיש דימר. אם נפריע ליצירת הדימר או לקשירת הליגנד לרצפטור אנו נפריע לחלוקת התאים. אנו רואים שבמצב ללא עיכוב אז מספר העותקים של הגנים עולה ה-mRNA עולה יותר רצפטורים מבוטאים על התא וחלק מהרצפטורים מופרשים אל מחוץ לתא ל-ECM. הדבר קורה עקב ביטוי יתר והחלק שמופרש הוא רק החוץ תאי מהרצפטור. זה חשוב לנו כי הנוגדנים יכולים להיקשר לחלקים אלו ולא לרצפטור שעל התא. ואז ייווצרו קומפלקסים אימונים שגורמים לבעיה בכליות. רק פרקציה קטנה יחסית של הרצפטורים נחלת.

כשלקחו קו תאים אנושי MCF-7 שהם תאי סרטן שד שהם לא מבטאים HER2 עושים להם טרנספקציה עם הגן ל-HER2 ומסתכלים מה קורה לאלה שהפכו ל-HER2<sup>+</sup>. אנו רואים שכמות ה-DNA גדלה ב-50 עד 70 אחוז וקצב הגדילה גדל ב-30 עד 50 אחוז. הגדילה באגר רך בניגוד לתאים רגילים שצריכים מצע מקבע כדי לגדול עליו כלומר, מצע מגדל ובתאים סרטניים הם יכולים לגדול באגר רך פי 225%. ניתן להשתיל בעכברים ערומים (בלי מערכת חיסונית) גידולים מתחת לעור ושם מידת העלייה בגידולים גבוהה וגם המטסטוזות (מטסטוזות כלומר, נדידת הגידולים לאזורים שונים) ב-Nude Mice עולה ב-220%.

מכאן שביטוי HER2 תלוי במידת האגרסיביות של הגידול. כשהיו נוגדנים ל-HER2 אז ניתן לבצע אימוני היסטוכימיה כך שמקבעים רקמה בריאה ורקמה חולה ומוודאים שחלבון המטרה לא ייהרס אז צובעים את הרקמה עם הנוגדן ואז אם נוגדן שני בעל יכולת פלורצנטית. ניתן גם לבצע מבחן Fish בו צובעים את הגן בכרומוזום וצובעים גם גן ביקורת בדרך כלל אקטין. הראו שניתן לקבל אמפליפיקציה של פי 100 של HER2. אז החלו לבנות נוגדנים נגד HER2 הם גילו ש In Vitro ראו שיש או חסימה של הליגנד או שמורידים את רמת הביטוי של HER2 מה שהופך אותם לפחות טומורגנים משם עברו לבדיקה בחיות וראו שהנוגדנים מצליחים להוריד את המסה של Xenografts (העברה של גידול מחיה מסוימת לחייה אחרת) ב-Nude Mice.

הליגנד ל-HER2 עדיין לא ידוע לא הצליחו לגלותו עד היום וחושבים שאין לו ליגנד משלו. הנוגדן הזה בעצם ניקשר לרצפטור וגורם לרצפטור לעבור אינטרנליזציה. זה שגילו שקישור הליגנד לרצפטורים ל-GF גורם לאינטרנליזציה של הרצפטור. כך שבאופן רגעי יש Down Regulation על פני התא רצפטורים אלו נכנסים לתא ושם הנוגדן לא מתפרק מהם אלא נשאר ומסמן לפרוק של הרצפטור. ה-Recycling של הרצפטורים יכול להיות הן למחזור לפני התא או לדגרציה.

הנוגדן שפותח היה עכברי והיה צריך לו הומניזציה (Humanization) וזאת באחת משתי דרכים אחת, זה ליצור נוגדן כך שרק האזור שקושר את האנטיגן היה עכברי כלומר רק ה-Fab או ה-Fv. כיוון שאלו

אזורים קטנים הסיכוי לתגובה חיסונית נגדם קטן מאד. הגישה השנייה היא הומניזציה בה לוקחים שלד שלם של נוגדן הומני ושותלים בתוכו רק את ה- CDR's מהנוגדן העכברי שהם אלו האחראים לקישור. כך מקבלים נוגדן כמעט הומני זה מה שעשו ב- HER2 כך ש- 95% מרצף הנוגדן הוא אנושי ו- 5% עכברי. הפוטנציאל שלו לאימונווגניות נמוך מאד וכיוון שהוא הומני הוא גם מגייס את מערכת החיסון כמו נוגדן הומני רגיל. הבעיה היחידה היא גודלו המקטין את החדירות. האפיות שלו מאד חזקה והוא מאד ספציפי.

כיום משערים שההרספטיין גורם ל- Down Regulation לרצפטור HER2. בהרספטיין משתמשים גם למיפוי עוצמת המחלה. לביצוע אימונו היסטוכימיה למצוא ביטוי יתר של HER2 במידה ולא מוצאים אז החולה לא תטופל בהרספטיין אך מי שתהיה ב- Score ל- 2 או 3 תטופל בהרספטיין. מתוך ה- 30% שיש להן ביטוי יתר של HER2 אז 10 עד 20 אחוז מגיבות לטיפול בהרספטיין ועוד 30% מגיבות להרספטיין + תרופה נוספת. הסיבה לכך היא אגרסיביות הגידול.

ריטוקסן (Rituxan) הוא נוגדן שקדם להרספטיין הוא אושר על ידי ה- FDA ב- 1997. נוגדן זה החליף את כל הטיפולים הקונבנציונאליים שהיו מוכרים עד כה. הוא מכון נגד CD20 בתאי B Cell הם ייחודיים מאד לתאים מליגנים מסוג מסוים של לימפומות של תאי Pre B ותאי B לפני שהם הפכו לתא פלזמה. המשפחה של B Cell NHL היא משפחה של תאים התקועים בשל ההתפתחות ועל פניהם יש הרבה CD20. אין CD20 על תאי פלזמה וגם אין חלבון זה על תאי הגזע שמהם מתמיינים תאי B - מה שאומר לנו שגם אם נהרוג את כל תאי ה- B של החולה הוא יצור תאי B חדשים תקינים.

הנוגדן נעשה בשיטות הנדסה גנטית הוא כימרי בין נוגדן הומני לעכברי התוצאות הקליניות של המחלה היו שהחולים היו מוקרנים והתאים חזרו ואחוז גדול מהתאים שטיפל בכימותרפיה גם חזרו ונהיו עמידים לתרופות אלו. זה הגיע למצב ש- 60 עד 70 אחוז מהחולים לא הגיבו אחרי מחזור של טיפול לעומתם בטיפול בריטוקסן היה העלמות מוחלטת של התאים הסרטניים עד כדי כך שלא ניתן לראותם ב- PCR.

כשבאים עם נוגדנים שנקשרים לרצפטור זה יוצר תהליך הנקרא (Antigen Induced Cell Death) AICD, כלומר, אנו עושים אינדוקציה לאפופטוזיס מתברר שרצפטור זה כאשר הוא נתפס בצורה מסוימת הוא מפעיל קסקיד הגורם לאפופטוזיס של התא.

מה שמגביל אותנו היום זה כמות החומר הגנטי שניתן להכניס למאכסן. אנו יודעים שיש לנו רפרטוארים גדולים לסלקציה של נוגדנים פפטידים וכו' והרפרטואר שלנו תלוי ביכולת להחזיר DNA. התברר שניתן להכין ספריה לא מוגבלת בגודל ולא צריכה מאכסן והרעיון הוא ליצור ספריה חלבונים ולהציג אותה על הריבוזום כך שיש קשר פיזי בין הגן לחלבון שמתבטא בריבוזום. החלבון הזה מתקפל בצורה נכונה תוך כדי הסינתזה שלו בריבוזום. ומכאן הקונספט של Ribosome Display.

השיטה הזו הוצגה לפני 6 שנים במקביל לשיטה של RNA - Protein Fusion שיטה זו פתרה את הבעיה של שלב ה- In Vivo. בשיטות אחרות צריך ללכת אחורה למצוא את הגן בשיטה זו החומר הגנטי נמצא פיזית יחד עם החלבון שקשר את המטרה שבה אנו מתעניינים. כלומר קיים צימוד פיזי בין הגנוטיפ לפנוטיפ. דבר נוסף הוא שניתן ליצור Protein Evolution כי ניתן להכניס מוטציות תוך כדי פעולה.

ה- ssrA זה רצף שזה סוג של tRNA מיוחד שבה כקודון של חומצה אמינית אלנין והוא קשור לרצף של פפטיד שהוא תג המוסף לחלבון ולאחר הניתוק פרוטאזות ספציפיות מכירות את התג הזה ונפתרות ממנו. הסיגנל מחובר כאשר עוברים את הגודל הממוצע של גן שהוא 1.2-1.3Kb. כדי לאפשר ריבוזום דיספלאי צריך לבטל את ה- Stop Codon וגם למנוע קישור של ה- ssrA. את ה- RNA אנו מיצבים על ידי מבנים של Stem And Loop. אנו גם משתמשים במעקב RNase כי ה- mRNA לא מולקולה יציבה. אנו משתמשים ב- Extractum של תאים ולכן צריך RNase.

דיברנו על הצגה של ריבוזומים אמרנו שהבעיה בספריה במאכסנים מוגבלת בגודל המידע שניתן להכניס למאכסן. בהצגה על פני ריבוזום אין בעיה של מוגבלות בגודל המידע. גם כאן כמו ב- Phase Display

יש קשר בין הגנוטיפ לפנוטיפ כי הגנוטיפ ה- RNA קשור לריבויזום באופן ישיר. הדרישות לכך הן בהתחלה לבטל את ה- Stop Codon ולאחר מכן יש לבטל את ה- ssrA שיודע לזהות מצב בו אין stop ומסמנת לדגדגציה מידע של החלבון. כך התא נפתר מחלבונים לא נורמאליים. ה- ssrA זה מבנה של Stem And Loop המקודד לפפטיד ואתר האינטראקציה זה קודון של אלנין. הפפטיד שנוצר מהרצף הזה מתלבש על החלבון שיוצר ומסמן אותו לדגדגציה.

יש כמה אלמנטים שאנו מכניסים כדי שזה יקרה. בראשונה אנו מורידים את ה- Stop Codon לאחר מכן עושים שינויים ב- RNA כדי לייצבו על ידי מבני Stems And Loop אנו משתמשים במעכבים של RNase בנוסף לכך צריך שהחלבון שנוצר יקופל בצורה נכונה והחלבונים בדרך כלל משתחררים ב- ER ושם יש שפרונים שהם חלבונים שעוזרים להם להתקפל. אנו משתמשים בהם גם כאן בשפרונים עם החלבון בנוי ממספר תתי יחידות אנו נותנים ביניהם רווח כי לכל תת יחידה יש קינטיקה וקצב התקפלות עצמאי שונה ורק בסוף החלבון מקבל את כל הקונפורמציות שלו. אלמנט נוסף הוא יצירת לינקר C טרמינלי דרכו אנו עושים את הקישור לריבויזום.

את ה- mRNA אנו מכניסים לליזט של תאים המכיל ריבויזומים לאחר יצירת החלבון אנו חושפים את הריבויזומים לסלקציה על ידי קשירה למוטציה עם חלבון מטרה. לאחר שמוצאים את הנחוצים אנו מנתקים את הקשר בין ה- RNA לריבויזום. מה- RNA הזה מסנתזים DNA וקובעים רצף או שחוזרים על הניסוי לסלקציה נוספת במערכת זו אין צורך במאכסן. בגלל שזו מערכת על תאית אז ניתן במעבר מ- RNA ל- DNA בעזרת PCR לעשות מניפולציות ולהכניס מוטציות וכך להכניס את המערכת של המוטנטים לסלקציה נוספת כך ניתן לבצע סלקציה יעילה עם שינויים גנטיים.

דוגמה לקחו scFv של נוגדן כימרי Hemagglutinin שהוא חלבון על מעטפת נגד אינפלואנזה (שפעת) ניתן לקחת מערכת מודל עם אותו scFv ולערבב אותן עם  $10^8$  מולקולות של scFv לא רלוונטי ומתחילים לבצע סלקציה ורואים כי לאחר 5 מחזורי סלקציה באמצעות hag אז 90% מהקומפלקסים הריבויזומלים הכילו scFv hag שזה כ- 2 סדרי גודל בכל מחזור אחרי מחזור 1 רואים רק את ה-  $10^8$  שנספחו לא ספציפית אותם מעשירים ומכניסים לסיבוב שני ולא רואים שיפור בסיבוב השלישי כבר רואים בנד של הנוגדן הספציפי בסלקציה הרביעית ובחמישית מקבלים השתלטות של ה- scFv hag. זה מראה לנו באופן עקרוני שהמערכת שלנו עובדת.

כיום ניתן להשתמש בשיטות על תאיות וליצור תצמיד בין הגנוטיפ לפנוטיפ בלי בעיה של גודל הספרייה. יש סוגים שונים של אנטיביוטיקה המעכבים פעולות של הריבויזום המונעות ממנו להיפתח. לדוגמה, פורומיצין לא מאפשר ל- RNA להתנתק מהריבויזום ואז לא צריך את הטריקים של להוריד Stop Codon ו- ssrA.

### התערבות אימונולוגית נגד סרטן.

ניתן לקחת את מנגנוני החיסון ולשנות אותם לתפקידים שונים. ניתן לקחת לדוגמה T Cell שמכיל רצפטור שניתן להפוך אותו לנוגדן מסיס בעל יכולות של T Cell.

מערכת החיסון יודעת לפעול באופן אקטיבי כנגד תאים סרטניים. וזאת עקב זה שהם רואים בתאים כזרים ופועלת נגדם במערכות שונות של נוגדנים מקרופאג'ים המפרישים TNF שהוא טוקסי לתאים סרטניים. יש גם Natural Killer Cell שלא תלויים ב- MHC ויש גם תאי T לימפוציטים מסוג CTL שמכירים תאים סרטניים והורגים אותם יש גם לימפוציטים הנקראים TILS שפועלים נגד תאים סרטניים בלבד.

כל האינטראקציות במערכת החיסון מתרחשות דרך MHC יש שתי משפחות Class I המוצגת על כל תא בגוף ו- Class II המוצגת על תאים מיוחדים של מערכת החיסון המציגים אנטיגנים למערכת החיסון כדי שתלמד לפעול נגדם. Class I בנוי משרשרת ארוכה הנקראת Heavy Chain ושרשרת קצרה הנקראת  $\beta_2$  מיקרוגלובולין שלא קשורה קוולנטית לארוכה אך מייצבת אותה. החלק שנמצא מחוץ לתא בנוי מ- 3 דומיינים  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ו-  $\beta_2$  ה-  $\alpha_1$  וה-  $\alpha_2$  יוצרים כיס בנויה מ-  $\beta$  Sheet שבו יש אנטיגנים שהם פפטידים. שהם ממה שהתא מפרק מהאנטיגן שנכנס אליו.

פפטידים אלו הם בעלי גודל קבוע של 8-10 חומצות אמינו שזה הגודל המתאים לכיס. הפרוטאוזום לוקח את חלבוני התא שזומנם למות וקוצץ אותם לפפטידים קטנים וחלק מהם מתאימים למולקולות ה-MHC הנצרות ב-ER ושם יש מולקולה שנקראת טאפ Tap המעבירה אותם ל-MHC מהציטוזול ל-ER ואז ה-MHC יוצא ומוצג על פני התא. על תאי ה-T יש קולטן שנקרא T Cell Receptor המזהה את ה-MHC עם האנטיגן וכל T Cell Receptor יודע לזהות רק MHC עם אנטיגן אחד. תא ה-T שמכיר MHC I הוא CD8 והוא הופך לציטוטוקסי והורג את התא עם האנטיגן הזר.

העובדה שמערכת החיסון מזהה תאים סרטניים כזרים הביאה להבנה שבגוף יש כל הזמן טרנספורמציות סרטניות. התאים הסרטניים כוללים אמפליפיקציה של אונקוגנים יש היתקעויות (מלשון תקוע) בשלבים שונים של הדיפרנציאציה יש פפטידים שנובעים מחלבונים שמוצגים על MHC I והם נקראים TAA. למשל HER2 מוצג כולו על פני התא בסרטן וזה לא TAA אך חלקים ממנו יכולים להיות מוצגים על MHC וזה TAA.

יש אנטיגנים משותפים לסוגי גידולים שונים הספציפיים לסרטן בלי קשר ביניהם. קבוצה שנייה שהיא אחד מהחשובות ביותר היא אנטיגני דיפרנציאציה שנוצרים עקב זה שהתא הסרטני נתקע בשלב דיפרנציאציה מסוים. לתא הסרטני יש אותם אנטיגני דיפרנציאציה של השלב בו הוא נתקע אך הם לא מוצגים על הרקמה הנורמאלית שעברה שלב בהתפתחות זה, כי הם שייכים לקו תאים כלשהו.

קבוצה קלאסית נוספת היא אנטיגנים הנובעים ממוטציות והופכים לאונקוגנים לדוגמה Ras שקיים במצב נורמאלי ושי בו מוטציה הוא הופך לאונקוגן עם המוטציה באזור בו הפפטיד המוצג על ה-MHC אז הוא מזוהה כזר. מערכת החיסון יכולה לראות שינויים גם בחומצה אמינית אחת קבוצה רביעית היא אנטיגנים הנובעים מביטוי יתר למשל שהגן מופיע ב-100 עותקים כמו HER2 ואז מוצגים יותר פפטידים של החלבון הזה על MHC ביטוי מוגבר זה גם מזוהה על ידי מערכת החיסון.

הדוגמה האחרונה הם וירוסים הגורמים לסרטן המכילים חלבונים סרטניים ויראליים שהופכים למוצגים על MHC ובכך גם תאים אלו מסומנים כזרים. אך במצב של סרטן מערכת החיסון נחלשת ולכן אנו רוצים לעזור לה. יש וירוס הנקרא HTLV הגורם לתדירות גבוהה של לוקמיה באזורים שונים בעולם והוא גם ניקשר על MHC זה.

המולקולה של ה-MHC היא מולקולה מאד וריאבילית וכל אחד באוכלוסיה נושא אלל אחר של MHC אך שינוי לא כל כך גדול. אם הוא היה כל כך גדול היה צריך תרופה שונה לכל אדם. מסתבר שיש כמה אללים יותר שכיחים באוכלוסיה ורוב הפפטידים הסרטניים מוצגים על אלל של MHC הנקרא Human Loicucit Antigen או בקיצור HLA-A2 הנפוץ באוכלוסיה הלבנה.

האינטראקציה בין ה-T Cell Receptor ל-MHC היא נמוכה ( $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  המקסימום הוא  $10^{-6}$  מולר) המבנה המרחבי של T Cell Receptor ושל הנוגדנים הוא מאד הומולוגי ומכאן הם כנראה מגן משותף שעבר התפצלות (בנוגדן הקישור היא באפיניות גבוהה  $10^{-8}$  –  $10^{-9}$  מולר). המוסג On Rate זה הקצב בה המולקולה נקשרת ו- Off Rate זה הקצב שבו היא עוזרת ב-T Cell Receptor שניהם מהירים בנוגדנים ה-On Rate מהיר וה- Off Rate איטי מאד ולכן האפיניות של הנוגדנים חזקה יותר.

כמות ה-T Cell Receptor הספציפית היא בכמות קטנה מאד ניתן להרכיב אותם בתנאים Ex Vivo ולהחזירם לחולה אך גם אז הם לא פעילים או שהם הורגים או שהתא הסרטני מפתח מנגוני עמידות נגדם.

אנו יכולים ליצור נוגדן רקומביננטי עם ספציפית של T Cell Receptor (TCR) אך בעל תכונות של נוגדן המכיר את הקומפלקס של ה-MHC עם הפפטיד רק שהפפטיד הוא מסוים מאד שזה פפטיד של 9 חומצות אמינו כש-4 מהם הם Anchor כלומר מעגנת את הפפטיד ל-MHC.

בשיטות של היברידימות היו מעט הצלחות אך לא על מולקולות הומאניות. הרעיון הוא לקחת נוגדן ולעשות אותו ל – TCR Like. את זה עושים על ידי קודם כל להכין MHC רקומביננטי בכמות גדולה. ניתן לקחת תאים הומאניים שהם HLA-A2 ולנקות את המולקולה ה – MHC מאדם. זה הבעיה היא פפטידים שונים אלפים במספר שמקורם בתאים כשמציאים מ – MHC את הפפטיד הוא לא יציב ומתפרק.

ניתן להוריד את הפפטיד ולהלביש פפטיד חדש במהירות זה עובד אך פחות יעיל מציירת HLA-A2 רקומביננטי בחיידקים כך ניתן לקפלו במבנה עם איזה פפטיד שנרצה וכך נקבל אוכלוסיה הומוגנית של HMC עם פפטיד מסוים. אנו מחברים את ה –  $\beta 2$  עם HLA-A2 על ידי פפטיד לקבלת גן אחד. אנו נותנים ל – MHC הזה להתקפל עם פפטיד במבנה ומקבלים מולקולה הומוגנית של פפטיד זה.

ניתן לבדוק את מסת הקומפלקס על ידי mass ספקטרוטר עם ה – MHC לא מקופל אז הוא לא קושר פפטיד. ניתן לקשור את ה – MHC לקולונה ולזרוק את הפפטיד לתוך mass ספקטרוטר וכך נדע האם התקבל קומפלקס נכון, אם המסה תהיה זהה לזה של הפפטיד שבה השתמשנו. את החלבון שוברים לפפטידים קטנים ומוודדים את המסה שלהם ובודק היכן יש חפיפה ובעזרת תוכנת מחשב מקבלים פיק אחד של ה – scMHC שיצרנו. שמחשבים את היחס המולרי ביחס לפפטיד מקבלים 1:1 כלומר, שהקומפלקס היה ביחס של 1:1 ורק חלבון שמקופל נכון יראה זאת.

אפשרות שנייה היא לפי הכרה של תכונות MHC כלומר, קישור ל – TCR אך האפיניות כל כך נמוכה שלא ניתן לבדוק את הפעילות ולכן יש מבחן אלטרנטיבי לקישור וזה על ידי פרוליפרציה כיוון שבאופן פיזיולוגי ה – T Cell Receptor עובר אקטיבציה עם ה – MHC בעזרת מולקולות עוזרות. אם נחזק את הקישור אז לא צריך את המולקולות העוזרות. לאחר הפרוליפרציה של תאי ה – T הם מתחילים להפריש חומרים לאחר זמן רב נמצא מנגנון של הטבע לקומפנסציה על אפיניות חלשה וזה אבידות כלומר, הוספה של יותר מאתר קישור אחד. ככל שמעלים את מספר אתרי הקישור האבידות עולה.

אם נגביר את האבידות של ה – MHC על ידי חיבורו למולקולה הנקראת סטרפט אבידין שאליה יש אפיניות קישור חזקה מאד לביוטין ( $10^{-15}$  –  $10^{-16}$  מולר) ולסטרפט אבידין יש 4 אתרים כאלו. על הקצה ה – C טרמינלי של ה – MHC אנו מהנדסים tag שהוא אתר עם ליזין שעליו אנזים של E. Coli יוצר Biotin Ligase כלומר, מוסיף ביוטין בנקודה ספציפית על הליזין מה שלא מפריע ל – MHC וכך מדגירים אותם עם סטרפט אבידין. וכך מקבלים על סטרפט אבידין עם 4 מולקולות MHC זהות. לזה קוראים MHC Peptide Tetramer. עכשיו ניתן לתפוס תאי T עם הקומפלקס אל אף שהאפיניות נמוכה בזכות האבידות כך נוצרים אגרגטים שבהם יש אוכלוסיות ספציפיות של תאי T.

בעזרת מכשיר FACS ניתן לקחת אוכלוסיה של תאי T ולצבוע אותם עם סמן של תאי T ציטוטוקסים ניתן לקנות סטרפט אבידין עם סמן פלורצנטי מכינים שני טטראמרים אחד עם פפטיד שלא קשור כביקורת והשני עם פפטידים שרוצים לבדוק אותם ולראות האם לחולה יש תאי T הספציפיים לפפטיד הרצוי.

על ציר ה – X יש סמן שמראה שתאי ה – T הורגים ועל ציר ה – Y יש את הסמן לטטראמר. אנו רואים כי בימני בשקף אין את הקומפלקס לפפטיד הסרטני ואילו בשמאלי יש אוכלוסיה הנצבעת הנובעת מהטטראמר במכשיר FACS ניתן להגדיר לדוג רק את האוכלוסייה הזו כך ניתן גם להראות שהקומפלקסים פונקציונלים.

אמרנו שמערכת החיסון לומדת מה נעשה בתוך התאים תוך כדי הצגה על MHC I על כל התאים שלנו. אנו ממירים את ה – T Cell Report לנוגדן מסיס הקושר באפיניות גבוהה יותר אך באותה ספציפיות לצורך כך אנו משבטים את ה – MHC עם  $\beta 2$  מחובר. אנו מבטאים רק את החלק שמחוץ לתא כי מה שבמבראנה ומה שבוך התא לא מעניינים אותנו ומפריע למסיסות לזה קוראים scMHC. אנו מבודדים אותם ומפתחים מערכת קיפול עם In Vitro כי ב – E. Coli הוא לא מקופל כמו שצריך. כך שהם יתקפלו בנוכחות פפטיד וכך מקבלים אוכלוסיה הומוגנית ונקייה של קומפלקסים. אנו רואים באנליזה בעזרת MS (Mass Spectrometer) שבכל קומפלקס יש פפטיד אחד.

עד לפני כמה שנים היו מולקולות בודדות של MHC האפיניות של המונומר נמוכה ולכן הגבילו אבידות על ידי יצירת טטראמר על סטרפט אבידין בטטראמר זה יש 4 מולקולות MHC זהות עם פפטיד זהה. כך פר יחידת שטח יותר רצפטורים היו תפוסים זה מעלה א האבידות אל אף שהאפיניות נשארת נמוכה. באמצעים אלו ניתן להכין טטראמר על פפטידים ידועים לסרטן מסוים ובעזרת מכשיר FACS ניתן לדעת איזה אוכלוסיה של הלימפוציטים בחולה הם נגד סרטן זה.

כשלקחו קו תאים ומגיבים אותו עם קומפלקס בלי ביוטינילציה אין יצירת טטראמר. וכמעט אין אקטיבציה יש אקטיבציה ספונטנית. כשיש ביוטינילציה ויצירת טטראמר יש אקטיבציה חזקה מאד. ניתן לראות לפי אקטיבציה ספציפית לפפטיד מסוים על ידי ביקורת למשל, לפפטיד 209 שמקורו באותו חלבון של פפטיד 280 וחלבון נוסף זר אז רואים שהספציפיים ל – 209 מגיבים רק איתו ולא עם האחרים.

ככל שריכוז הטטראמר עולה גדלים האגרנטים שנוצרים. כשבמקום סטרפט אבידין רגיל משתמשים באחד פלורצנטי ואת התאים צובעים לפי מרקרים שונים ואז בעזרת מכשיר FACS ניתן לראות אוכלוסיה הצבועה בשני הצבעים. כיום ניתן לבצע דיטקציה (גילוי) לאוכלוסיה של 0.02%.

ניתן לבצע Clone שבו לוקחים CTL שמקורו מתא אחד ולהרבות אותו לשימוש במולקולות כאלו יש אפליקציה מעניינת שהיא דיאגנוזה של מחלת סרטן וכו'. ניתן להשתמש בזה לבדוק חולים ממשפחות שרגישות למחלות מסוימות ולראות אם גוף האדם הוא בעל רגישות גבוהה יותר בכך שמערכת החיסון מזהה דברים כאלו לפני כל גלאי אחר ואם מוצאים משהו סימן שתדירות המחלה שלו גבוהה מהנורמאלי.

קיים מכשיר FACS סטטי. מכשיר FACS רגיל בנוי מצניורות שדרכם עוברים תאים ולייזר שקוראים את התאים העוברים (כיום ניתן כבר עד 16 צבעים סימולטאנית). זה מכשיר של זרימה ולא כמו לחזור על תאים שעברנו עליהם מכשיר זה מוגבל לקריאה רק של פלורסנציה גודל תא ומידת הגירעון. כשתאי T עוברים אקטיבציה אז יש בהם שינויים ומכשיר זה לא יכול למדוד אותם אך FACS סטטי כן. כיוון שבו יש מעל הלייזר גריד בו יש 10,000 חורים עליה מטפטפים טיפה של תאים וכל תא נכנס לבארות (בכל בארות יש יציאה לנוזלים וכו') כך ניתן לראות את התאים להוסיף חומרים לבדוק שוב את התאים.

אנו רואים שבאדם בריא כמעט ולא נצבעים לימפוציטים לפפטיד הספציפי למלנומה. בעוד שבחולה יש הרבה תאים בעוצמה חזקה סימן שהם קשורים בצורה טובה את הטטראמרים כי יש להם הרבה רצפטורים. יתרון נוסף ב – FACS הסטטי הוא היכולת לבדוק דברים פסיקליים אחרים כמו קיטוב של אור וראו שיש ירידה בקיטוב של חומר פלורצנטי באקטיבציה של התא החומר הפלורצנטי הזה מתחבר לחלבונים ולא מפריע להם. את החומר הפלורצנטי מוסיפים לאחר ההזגרה עם הקומפלקס כדי לבדוק אקטיבציה וכך ניתן לראות אם התאים הם פעילים או לא. אם הירידה בקיטוב ניתנת לצפייה תנועת ההיסטוגרמות כך שיש ירידה בקיטוב של כ – 10% (זה הרבה).

CON A זה חומר שעושה אקטיבציה כללית והוא מוריד כמעט ב – 6% בעוד ש – MARTI כללי הם 4.2% הורדה בקיטוב. כאשר אנו מסתכלים רק על האוכלוסייה של MARTI שעברה אקטיבציה עם הטטראמר מקבלים ירידה של 12.1% (היום כבר מצאו כאלו של 20%). כלומר, במכשיר ה – FACS הסטטי ניתן לבצע גם בדיקה ביולוגית ולא רק פלורסנציה.

בנוגדנים הומאניים יש בעיה של נוגדן נגד העצמי. בנוגדנים עכבריים יצרו נוגדנים נגד כל מיני אזורים ב – MHC ולא דווקא לאזור עם הפפטיד ולכן לא ניתן לבודד נוגדנים שהם דמויי TCR. ניתן ליצור עכבר טראנסגני ל – MHC הומאני עם Knock Out – MHC העברי כך מקבלים עכברים עם מערכת חיסונית של HLA-A2 כמו הומאני. לעכברים כאלו מזריקים את הקומפלקסים ובונים ספריה של scFv עושים מבחן ELISA וכך מקבלים אוכלוסיה הספציפית רק לנוגדן אחד. אז מקבלים כל הזמן רקעים עקב Cross Reaction בעזרת נוגדנים המשותפים לשניהם. כדי להפריד משתמשים בטריק שבו הקומפלקס קשור בבידים מגנטים והלא ספציפי היה בעודף כך שאלו שמכירים את שניהם יקשרו ל – 280 ואלו הספציפיים ל – 209 יקשרו לקומפלקס שעל הבידים ואז נשטוף ונקבל נוגדנים שהם מועשרים לפפטיד

209 לאחר מספר מחזורים. נוגדנים אלו מתנהגים כמו TCR מפאג'ים אלו מוציאים את הגן ויוצרים נוגדנים מונוקלונלים ורואים שמעל 90% מכירים את ה- 209 בלבד.

אנו עושים Finger Print לכל הקלונים הללו לראות דומיין ושוני בנוסף מבצעים RFLP וגם בודקים רצפים ורואים שכולם היו אותו נוגדן. גודל הספרייה שיצרנו היה  $5 \cdot 10^8$  וממנה דגנו נוגדן אחד דבר שלא ניתן לביצוע בהיברידומה רק ב- Phase Display.

עכשיו צריך להראות שנוגדנים אלו נקשרים לתאים ולזה משתמשים במערכת של תאים מאדם המכילים כבר פפטידים מתוך התאים אך אנו צריכים אוכלוסיית תאים עם פפטיד 209 ולכן יוצרים קו תאים מוטנטי עם מוטציה ב- TAP שזה המשאבה המעבירה את הפפטידים מהפרוטאזום ל- MHC I כך מוצגות מולקולות MHC לא יציבות לפני התא. אנו שמים במדיום את הפפטיד 209 כך שהוא נקשר ל- MHC ומייצב אותו. צריך לבדוק שהפפטידים מוצגים באותה מידה ואז בודקים קשירה לתאים ורואים שהנוגדנים נצמדים רק לאלו עם הפפטיד המתאים.

אם אנו רוצים לכסות מגוון של פפטידים אז יש בעיה שצריך לכל אחד ספרייה בפני עצמו. או שימוש בספריות נאיביות שנבנו בבני אדם שגודלם גדול מאד ומהם ניתן לדוג נוגדנים נגד כל מה שמעניין אותנו אך הבעיה למה שלאדם ברפטואר יהיה נוגדנים עצמיים נגד ה- MHC אך למרות זאת סורקים אותה ומקבלים תוצאות חיוביות כי אנו עושים רקומבינציות שונות של  $V_L - V_H$  ובצורה רנדומאלית זו מקבלים גם אופציות שלא קיימות בטבע כלומר נוגדנים נגד MHC.

השתמשנו בספרייה של  $3.7 \cdot 10^{10}$  זו ספרייה של Fab ונמצא שכנגד כל קומפלקס שנסרק היו נוגדנים עם פעולות של TCR ואף כ- 80% היו כאלו שקשרו רק את הקומפלקס שלנו לא שום דבר אחר ולכל קומפלקס היו מספר נוגדנים שונים ואפילו עד 20 נוגדנים שונים לאותו קומפלקס.

מכאן שיש מערכת של בקרה חיסונית בגוף שמונעת את זה. האנטיגן דיפרנציאציה במלנומה gp100 יש 3 פפטידים שהם אפיטופים טובים והם הפפטידים 154, 209 ו- 280 ואת הספרייה סרקנו איתם ומצאנו נוגדנים ספציפיים לכל אחד מהפפטידים הללו באופן ספציפי לחלוטין אפילו לא לשני אפיטופים האחרים. האפיניות של הנוגדנים הללו היא גדולה מאד והם מכירים את הקומפלקסים על שטח פני התאים.

כשבדקו את זה על תאים של מלנומת HLA-A2 המבטאים gp100 ורואים שהם נצבעים ברמות גדולות של הנוגדן אנו רואים בביקורת שתאים שהם HLA-A2 נגטיב אל אף שיש בהם gp100 הם לא מסומנים כי הם לא HLA-A2 כנ"ל גם עם gp100 אם נבדוק גידולים סרטניים שלא משחררים gp100 הם לא יצבעו (לדוגמה סרטן שד).

טלומראז הוא חלבון שמתבטא ב- 85% מכל הגידולים הסרטניים וגם לפפטידים ממנו 540 ו- 865 מצאו שנוגדנים ספציפיים לטלומרים שהורגים גידולים סרטניים מסוגים רבים (בתוך 85% הנ"ל) לפפטידים כאלו קוראים Universal Peptide.

אנו יכולים תוך כדי ניצול האינפורמציה במהלך העבודה ליצור מרכיבים תרפויטים (בעלי פעילות רפואית). התאים הסרטניים מפתחים מנגנון אקטיבי כדי להתחמק מהתרופות שנגד התאים למשל בטיפולים כימותרפיים נוצרים חלבונים שהם MDR כלומר, Multi Drug Resistant שמוציאים את התרופה מהתאים. כמו כן התא גם מתחמק ממערכת החיסון על ידי הורדת רמת הביטוי של MHC I ואז התא יכול לשגשג אל אף שבפוטנציה המערכת החיסונית יכולה לפעול נגדו.

הדבר מופיע בתדירות גבוהה של כ- 50% מהתאים ואף יותר במטסטאזות. יש לנו בתא נורמאלי הרבה קומפלקסים של MHC I והרבה מולקולות שקשורות לרצפטורים הקשורים לגידול. בתא סרטני מספר רצפטורים אלו עולה בעוד שמספר ה- MHC I יורד. ניתן לקחת נוגדן הנקשר למולקולות על רצפטורים אלו ועליו היה מחובר הקומפלקס של MHC וכך יוצג ה- MHC על התא על אף שהם הורדו. כלומר, אנו בעצם מחזירים את ה- MHC לתאים שהורידו אותו אנו משתמשים ברצפטור שאופייני לתא הסרטני ואת הרצפטור הזה התא לא יכול להוריד כי התא הכרחי לסרטן.



את הנוגדן יוצרים על ידי לקיחת הגן ל – scMHC ומחברים אותו בלינקר ל – scFv או dsFv וכך מקבלים תוצר עם זרוע שמבצעת טרגטינג וזרוע שנייה שמהווה Effector לפעולת ה – MHC. כך ניתן למשוך CTL לתא הסרטני שיהרוג אותו. על ה – MHC הללו אנו שמים פפטיד זר מאד אימונוגני וכך מעוררים זיכרון של תא T לפפטיד זה ומביאים CTL כנגדו.

אנו בודקים האם המולקולה יכולה להיקשר וזאת על ידי תאים שמבטאים את הרצפטור ותאים שלא מבטאים אותו. ובודקים קישור אנו רואים שכאשר אין רצפטור אין קישור ושיש אז יש קישור לאחר מכן צריך לבדוק האם התאים היו עמידים קודם עכשיו מתים. אך לפני זה בודקים עם ה – MHC נשאר תקין על ידי נוגדן שני ל – MHC הזה. אנו רואים שהתאים עם הרצפטור שקיבלו את הנוגדן עם ה – MHC (HLA-A2) הפכו לבעלי MHC. כך גם בודקים האם התאים הסרטניים הם HLA-A2.

כדי לבדוק האם המולקולה פעילה אנו מציגים את התאים בנוכחות המולקולה וגם בנוכחות תאי CTL, שהם ספציפיים ל – MHC שעל המולקולה שיצרנו ואנו רואים שאין שום הרג עם תאי האם ללא המולקולה. את התאים עם הרצפטור בלי המולקולה בודקים ורואים שגם אין הרג בתאי האם בלי רצפטור ואם מולקולה אין הרג כי אין רצפטור שאנו לוקחים את התאים עם הרצפטור והמולקולה וה – CTL אז יש בין 80-100% הרג.

כאשר אנו מזריקים את המולקולה של ה – MHC עם הפפטיד האימונוגני אז תאי CTL עקרונית צריכים להיקשר בדרך זה קורה אך באפיניות נמוכה כי זה מונמר אך אם זה קורה זה גורם לפרוליפרציה של תאי CTL וזה מה שאנו רוצים כך שמגיעים לתא הסרטני יש הרבה CTL שעל התא הסרטני יש המוני קומפלקסים וזה מגביר את האבידיות כך שהקישור חזק יותר וגורם להרס התא הסרטני. אך יש בעיה שיתכן שהם יזהו הרבה מאד פפטיד ויחשבו שזה עצמי ויעברו Anergy מהניסויים In Vivo רואים הצלחה בהרג התאים.

### **Molecular Evolution – DNA Shuffling**

כיום משערים שיש כ – 30-40 אלף גנים המקודדים כ – 100 אלף חלבונים בעזרת שיחבור אלטרנטיבי, כמו כן אנו יודעים כי יש משפחות גנים. ניתן לנסות ליצור חלבונים בריאקציה PCR במבנה ולקבל חלבונים יעילים יותר ממה שקיימים כיום. לזה קוראים אבולוציה מולקולארית בה מחקים את האבולוציה על ידי סלקציות מכוונות כדי לשפר את הפעילות של החלבון. אנו יודעים שיש אבולוציה ובעזרת ביולוגיה חישובית ניתן במחשב לבצע סימולציה ובנית אלגוריתם שריקומבינציה שקוראת וגורמת למוטציות בתדירויות נמוכות מספקה על מנת ליצור אבולוציה ברצפים מוגדרים.

למשל המוגלובין הוא קולט חמצן יעיל באדם אך זו לא המולקולה הכי יעילה בקליטת חמצן ציאניד קולט חמצן טוב יותר. גם מערכת החיסון מראה למידה חזקה מאד. את הקידום באבולוציה אנו יכולים לבצע על ידי שימוש במוטגנזה בגן מסוים עד שנמצא שיפור. המוטגנזה ניתן לבצע בעזרת Error Prone PCR (EP-PCR) שבו הפולימראז יכול להכניס טעויות בתדירות גבוהה יותר מהנורמאלי זאת על ידי הורדת חלק מהפקטורים שהוא צריך כתוצאה מכך במקרה אולי אחת המולקולות שתתקבל תהיה יעילה יותר.

מוטציה שנייה היא בעזרת אוליגו נוקליאוטיד אז צריך לדעת את הרצף היכן אנו מבצעים את המוטציה. שיטות אלו לא הכי יעילות כי מקבלים אוסף של מולקולות עם שיפורים מסוימים אך לא חזקים מאד. לפני כ – 4-5 שנים מדען אחד אמר שריקומבינציה הומולוגית המתרחשת באופן טבעי מתרחשת מהתערבות של פול של גנים וכך ניתן לערבב גנים כלומר, לערבב DNA בעזרת מכשיר PCR לזה קוראים DNA Shuffling.

כלומר, הוא הציע לבצע ריקומבינציה הומולוגית בין מאגרי DNA הוא לקח DNA וחתך איתו לפרגמנטים עם DNase1 כך שיש מוטציה שונות בגנים שונים מבודדים פרגמנטים בגודל פחת או יותר שווה 50 – 100 בסיסים אותם מערבבים ומבצעים PCR. הפרגמנטים נחתכים אך יש ביניהם הומולוגיה כך שפרגמנט אחד משמש פריימר לפרגמנט אחר עד שמקבלים תוצר שהוא שיחלוף, ריקומבינציה הומולוגית של כל או חלק מהמוטציות על גן חדש. את הגן הזה הוא בדק כדי לראות מה שקרה והוא ראה

שהגן נותן פונקציה נורמאלית כמו של הגן המקורי. כך שעל ידי הערכוב קיבלו את הגן השלם והפונקציונאלי.

מתי ניתן לבצע את ה-DNA Shuffling זה שהגן היה ברצפים של 1Kb ומעלה. התדירות של המוטציות בתהליך היא מאד נמוכה 0.25% כמו הטעויות הרגילות של PCR. כמו כן אנו צריכים פול (POOL) של גנים אחרת זה לא אפשרי. אנו גם צריכים לבדוק האם התוצר הסופי משפר את החלבון או לא.

יש גם מוטציות המתקבלות באופן טבעי והם מוטציות שקטות בעיקר. במקרה זה מוטציות אלו מכניסות רעל למערכת כך שמבצעים הכלאה לאחור עם ה-DNA הפרנטלי ובכך מעלימים את המוטציות הטבעיות בתהליך רגיל של ריקומבינציה. חלבונים עצמם מיוצרים לינאריים אך הדבר שקובע את הפעילות הוא המבנה המרחבי הנוצר מדומינים המחולקים ל-2 אחד כאלו שנותנים את השלד Scaffold-like ועליהם יש את הדומינים האחראים לפעילות Functional.

אנו לוקחים משפחת חלבונים כמו EGFR שהם רצפטורים ל-EGF אז מסתבר שהאזורים הסטרקטורליים דומים מאד והאזורים הפונקציונאליים הם השונים. מכאן רואים שה-DNA שפלינג יעיל מאד כי האזורים הסטרקטורליים נשארים קבועים בעוד שהאזורים הפעילים משתנים. ה-Scaffold הוא זה שקובע את המבנה המרחבי של המולקולה.

אמרנו שניתן לקחת מספר קשרי DNA עם שינויים קלים בחומצת אמינו של החלבונים וחוחכים אותם ומחברים מחדש. כך שכל חתיכה יכולה להיות פריימר לחתיכה אחרת בסופו של דבר נקבל ריקומבינציה ותוצר שיכול תערוכת של כל הרצפים בסופו של דבר משתמשים בשני הפריימרים לקצוות לקבלת הגן בכמות גדולה יותר וניתן לראות שבעקבות הריקומבינציה קיבלנו מחדש פעילות שב-84% מהמקרים עם הגן Lac Z. כך הראו שהריקומבינציה נותנת גן פונקציונאלי.

על אותו עיקרון על רצף של גן אחד הכניסו אתרי רסטריקציה שלא היו בשני בצעו Shuffling ובסופו של דבר קיבלו בגן הרקומביננטי את שני המוטציות מכל אחת מהצדדים מה שקורה שהמוטציות נקלטות בריקומבינציה שמקיימת ברוב התוצרים. את התהליך רצוי לבצע בגנים הגדולים מ-1Kb להגברת היעילות רוב הגנים הם 1.2-1.5Kb צריך גם שקצב מוטגנזה היה בדרומה ל-EP-PCR. אנו גם נוכל לשייך גן למשפחה בלי לדעת את הרצף המלא. ניתן לסלק מוטציה טבעית על ידי הכלאה חוזרת עם גן הבר.

האנזימים  $\beta$  לקטמזות מפרקים את הטבעת הלקטמית באנטיביוטיקה הם מפותחים על ידי חיידקים כדי לפרק את האנטיביוטיקה. החוקרים רצו להראות שניתן להפוך את ה- $\beta$  לקטמז לפעול ביתר וכיוון שמדובר בבקטריה עם חלוקות רבות והרבה מוטציות שנוצרות מרקומבינציות וכך ניתן להשוות את הקצב הוא לקח 4 רצפים של  $\beta$  לקטמזות וביצע Shuffling ובדק פעילות. הוא קיבל רקומבינציות אך לא של רצפים בודדים אלא של ממש קטעים שלמים של DNA שעברו ממקום למקום וזה מתאים להומולוגיה מבנית ופונקציונאלית שנוצרים עקב ה-Domains. כלומר, הגושים הם מתאימים ל-Domains המתאימים מבנית ופעולתית.

בניסויים אלו אנו מחשבים mic שזה מה הריכוז המינימאלי של אנטיביוטיקה שיעכב את גידול החיידק ככל שה-mic יותר גדול אז צריך יותר אנטיביוטיקה כלומר ה- $\beta$  לקטמז פעיל יותר. ה-W.T. הוא בעל mic=0.02 $\mu$ g/ml לאחר מספר סיבובים והכלאה סופית קיבלו mic=640 $\mu$ g/ml זה הרבה יותר טוב. על כל סיבוב של Shuffling צריך לחץ סלקטיבי לקבלת רקומביננטים היעילים ביותר בעזרת העלאת ריכוז האנטיביוטיקה אחרי סיבוב אחד עשו סלקציה עם פי 10, בשנייה פי עוד 10 וכך אלה המוטנט היעיל ביותר היה עמיד מול 320mg/ml.

אנו מקבלים גם מוטציות ניטרליות שהם משנות את ה-DNA אך לא נותנות שיפור ביעילות ואפילו מעכבים. ולכן את המוטנט הטוב ביותר אנו מכליאים עם ההורה שלו מתחילת הניסוי להורדת המוטציה הניטרלית בסלקציה של הכלאה זו אנו מעלים עוד יותר את ריכוז האנטיביוטיקה.

זה תהליך אבולוציוני שבטבע היה לוקח מיליוני ואף מיליארדי שנה. באותו עיקרון נעשה גם עם הגן Cephalosporinase. יש השראה בין Point מוטציה ל – Shuffling הייתה עליה בעמידות ברמה גבוהה בהרבה. הוא קיבל גם אזורים שלא שייכים לשום רצף (באפור) והם משחלף Non Homolog Cross Over (באדום מוטציה סומאטית נקודתית). הקטע האפור מקורו מהגנים הללו אך לא ניתן לזהות את מקורו. החלבון הסופי נראה כמו מוזאיקה הבנויה מחלקים גדולים מהחלבון עוברים ויוצרים כימרות והקטעים החדשים הם נוצרו לצורך הקיפול הטוב ביותר כלומר, הם נמצאים באזורים המחברים אזורים פונקציונאליים וזאת בלי לשנות את האתר הקטליטי.

בשפלינג בודדים מקבלים קלונים בעלי זהות גבוהה 97 – 99 אחוז ומרחב הסיקוונס (רצף) קטן בשפלינג משפחתי המרחב ענק ויש שיחלוף של בלוקים ליצירת כימרות עם שונות רצפות הרבה יותר גדולה ממה שאנו נקבל בשופלינג בודדים.

החלבונים אינטרפרונים INF הם בעלי מבנה של גוש אליקלי והם שייכות למשפחת הציטוקינים המשפחה של  $INF-\alpha$  היא בעלת פעילות אנטי ויראלית במשפחה זו יש מעל 20 גנים שעברו דופליקציות אך לא נבעו מאותו אלל יש בניהם 85% עד 89% דמיון מה שהופך אותם להיות נוחים לשפלינג. השונות במשפחות אלו גורמת לכך שיש 76 אתרים וירבילים ויכולות להיות במולקולה הטבעית 2, 3, 4 שינויים ב – 5, 15 או 4 אתרים באתר. כלומר  $4^{15} * 3^{57} * 2^{57}$  שזה  $5 * 10^{26}$  קומבינציות שונות של רצפים בין כל האתרים הללו וכל גן שווה ב – 17 נקודות מתוך 166 חומצות אמינו כך שמקבלים  $7 * 10^{22}$  אפשרויות לפיזור של המוטציות הללו. וזה לא ריאלי לבנו ספריה כזו.

ניתן לבצע שפלינג בין האינטרפרונים השונים את השפלינג עשו בכמה סיבובים את זה עשו על ידי שפלינג של כולם ולבחור את הטובים לסבב הבא (הם לקחו גם את הפסודוגנים). בסיבוב הראשון הם בודדו את המוטנט עם הפעילות הכי טובה כאנטי-ויראלית וכמדכא גדילה והתחלקות תאים סרטיים. במקום לעשות כסבבים הבאים שפלינג של כולם ניתן לקחת את ה –  $INF-\alpha$  הכי אקטיבי שנובע משפלינג של 6 גנים ועושים לו שפלינג עם הכי אקטיבי של  $INF-\alpha$  4 והם יוצרים 5 ספריות חדשות 4 מהם הם Pair Wise שהם הזיווגים של הטוב ביותר עם ה – 4 האחרים וספריה 1 שהיא Pooled של כולם.

מספריות אלו הם בודדו 1056 קלונים (שזה נמוך מאד) וסרקו אותם לפעולת אנטי-ויראלית ואנטי-גדילה הם קיבלו 11 פעילים ביותר וביטאו אותם וראו שקיבלו פי 185 יותר אקטיבי ושהשווה את המולקולה הכי טובה מה – 11 הללו הם קיבלו פעילות פי 285 אלף יותר טוב, מ –  $INF-\alpha_3$  שהוא המקורי הכי טוב. ובפעילות ביחס לסטנדרט שזה הקונסנזוס של כל ה –  $INF$  וקיבלו פעילות אנטי-ויראלית פי 554 את הקלונים הכי טובים הם קיבלו מהזיווג של הזוגות ולא מה – Pool של כולם.

מה שקורה הוא שמקבלים סמפלינג כלומר המערכת דוגמת את המולקולה ההיברידיית הטובה ביותר שיכולה להיות. ורואים שבחבילות ההליקסים כל הליקס נובע מ –  $INF$  אחר. האתר שנקשר לרצפטור הוא  $Arg^{125} - Iys^{121}$  והוא בנוי מקומבינציה של מספר  $INF$  כלומר האתר הפעיל בנוי מקומבינציה אך השלד כולו ממקור אחר.

ב –  $INF-\alpha$  הומאני ובעכבר  $INF-\beta$  ו –  $INF-\alpha$  עובדים באופן זהה כמו באדם אך ב –  $INF-\alpha$  זה לא כך אך שמשנים את החומצה האמינית 121, 125 לעכברות מקבלים פעולת גם שלו בעכבר והפעילות של ה –  $INF-\alpha$  עולה פי 400 ה –  $INF-\alpha$  בהומאני לא עובד על עכברי. אבל עכברי עובד על הומאני והוא יותר פוטנטי. כשעשו את השפלינג הם עשו גם בדיקה בעכברים וכך ראו שגם בשפלינג התקבלה פעילות של ה –  $INF-\alpha$  ההומאני בעכבר וזה בגלל ששני חומצות אמינו אלו הוחלפו כמו ל –  $INF-\alpha$  העכברי. והם ראו שהם הופיעו שניהם ביחד או כל אחד לחוד.

על אותו עיקרון החליטו לבצע שפלינג של גנומים. בבקטריות אנו לוקחים מספר בקטריות ממספר משפחות לוקחים את כל הגנים שלהם מבצעים מוטציות ושפלינג ועושים סלקציות לאלו עם התכונות הכי טובות ואז הקפיצות הרבה יותר גדולות. הדבר נעשה בחיידק המייצר אנזים בשם טילוזין שהוא משמש

להלבנת נייר והלכו ושיפרו אותו במשך 20 שנה. בעזרת מוטגנזה ומיליון בדיקות שונות הגיעו לזו שנקרא sf21 שהוא פעיל פי קצת יותר 3 מהמקורי.

בגישת השפלינג בשנה אחת הם עשו 24 אלף בדיקות הם עשו 3 שלבים שלב אחד של NTG המשרה מוטציה ושני שלבים של שפלינג אחרי השלב הראשון הם קיבלו מספר קלונים עם שיפור קל בפעילות לאחר שפלינג ראשון הם כבר קיבלו 1000 קלונים שמספר מהם הם בעלי פעילות שכבר עוברת במעט את מה שעשו ב – 20 שנה. כלומר את sf21 ואז הם עשו שפלינג נוסף וקיבלו 1000 קלונים שהם יעילים בהרבה מה – sf21 (25% לפחות יותר טוב מהמוטנט שעבדו עליו 20 שנה).

### פרויקט הגנום האנושי.

מטרת הפרויקט לקבוע את הגנום האנושי כדי לקשור גנים שונים לפנוטיפים מחלות וכך נוכל לאבחן מחלות בעובר עוד לפני הלידה וגם יתאפשר רפוי גנטי. בהתחלה הגורם שהביא להתפתחות בנושא זה שהמכונות שנתנו קרפים בהתחלה התחילו עם בקטריות שמרים דרוזופילה בהתחלה החלו עם רצפים מבודדים שאין ביניהם קשר לאחר מכן בדקו EST's שזה נותן ספריה של DNA. לאחר מכן הוסיפו את SNP's שזה הפולימורפיזם המאפיינים אותנו ובסופו של דבר מגיעים לגנום המלא.

כיום זה כבר שווה שיש את הטייטה של הגנום אך אנו לא יודעים את כל הגנים וסידורם רק את הרצף. כשהתעשייה נכנסה לפרויקט שהחל כממשלתי וחברת סלרה זירזה את הכנת הרצף אך בגישה שונה. הפרויקט הבינלאומי פעל בשיטות של מקטעים שהוכנסו לכרומוזומים מלאכותיים של בקטריה (BAC's) ולאחר מכן בדיקת הרצף של הקלונים הללו הקרואים קונטיגים ומקבלים אזורים של חפיפה וכך אפשר לבצע אסמבלי ולקבל את הגנום השלם לזה קוראים Shout Gun.

לא ניתן לבצע בדיקת רצף לקונטיג כי הוא גדול מידי ולכן חותכים אותו לקלונים ועם החפיפות ניתן לחזור אחורה לרצף המלא. לשם כך בנו כוח מחשוב אדיר לחבר את הרצפים הללו לקבל את כל הגנום הם איחדו כחצי מיליון קונטיגים. בפרויקט הציבורי עשו 23 אלף מגה בסיסים ברצפים סכך הכל קראו 4 מיליון קילובייט וסיימו קצת יותר מ – 800 אלף קילובייט. זה לפני שנה וחצי כשפורסם המאמר.

היו מקומות שבהם יש Gaps ולא יודעים עדיין מה חסר שם. הלינקג' הזה נבדק על ידי סמנים גנטיים. כיום עומדים להשלים את החללים הללו. היום לפי המאמר בחומר יש כ – 32 אלף גנים ללא חישוב של שיחבור אלטרנטיבי.

כשמשווים גנים הקשורים לתחומים שונים רואים תופעות מעניינות למשל לחרדל יש יותר גנים למטבוליזם מלבן אדם וכו'. ב – Translation לאדם יש יותר גנים מאשר בחרדל ובחיסוניות באדם פי כמה וכמה יותר גנים מאשר באורגניזמים אחרים.

הפרויקט של סלרה היה בשיטה אחרת העיקרון הוא Whole Genome Assembly הם לקחו את כל הגנום בקונטיגים שזה דוגמאות DNA ממספר אפלוטיפי (אנשים). הם קראו את הרצף מכמה אנשים על ידי יצירת BAC's ופרגמנטים גדולים של DNA והם כבר הכניסו את ה – SNP's (לא ניתן לקחת מאדם אחד). מזה הם בנו רצף של קונסנזוס וממנו בנו את השלב והם נתקלו ברווחים (חסרים Gaps) והלכו לפרויקט הציבורי ובעזרתם השלימו את הרצפים. וכך השלימו חלק מה – Gaps הללו וכך הם הגיעו לטייטה. סלרה תרמה רבות ביכולת הטכנולוגית, בסלרה מצאו שיש 26383 גנים אנושיים ללא שיחבור אלטרנטיבי.

### Gene Therapy ופרוטאומיקה.

הבנת חלבונים בעזרת MS. את החלבונים מפרידים בג'ל 2D לפי משקל ותכונות חשמליות ואז ב – MS בודקים את המאסה וניתן לבדוק אם החלבון מוכר או לא לפי מאגרי נתונים. כיום בעזרת Chip ניתן לבדוק כמויות גדולות של גנים וכיום בפיתוח גם Chip של חלבונים. הדבר יעיל לזיהוי כך שבבדיקת דם

אחת פשוטה ניתן יהיה לדעת את כל החלבונים. בעזרת פרויקט הגנום נדע את כל הגנים ומעורבותם במצבי מחלה וזה יביא ל – Gene Therapy.

הגן P 53 הוא טומר סופרסור הגורם לאפופטוזיס בתאים שמתפתחים לטרנספורמציה סרטנית ושיש בו מוטציה מתפתח גידול סרטני. יש עבודות המראות שבתא שבו יש כבר P53 דפקטיבי אז כשמכניסים אלל נורמאלי ניתן לתקן את הנזק והתאים יפסיקו להיות סרטניים. יש הבדל אם הגן התקין מחליף גן הפגיע מלידה לבין גן פגום בקולון מסוים. הדבר דורש ביטוי בתאי יונקים ללמידת הפונקציה של הגנים. הרעיון הוא גם שניתן לשלוט על ביטוי של גנים כך שניתן לשים אותו ליד פרומוטור הספציפי לרקמה מסוימת וגם ניתן לשלוט על הביטוי כלומר להדליק ולכבות אותו.

כשמבודדים גן ניתן לעשות מניפולציה שלו בחיות טראנסגניות או שעושים K.O. (נוק אווט) לגן ורואים את חשיבותו הפיזיולוגית של הגן. יש מספר שיטות להכנת חיות טראנסגניות. כיום ניתן לבדוד פרונוקלאי (גרעינים עם DNA) ולהכניס אותם לבידים ולהשתיל לעכברה עם הריון מדומה והצאצאים יכילו את הגן החדש. יש אפשרות להשתמש בוקטורים ממשפחת הרטרווירוסים שמהם ניתן להוציא תכונות של וירוסים בלי לפגוע ביכולת לעבור אינטראקציה לגנום.

אנו מכניסים את הגן הרצוי למקום החסר לעובר של 8 תאים הם מקבלים את הוירוסים ומבודדים צאצאים שקיבלו את הגן הספציפי שרצינו. שיטות יותר מתוחכמות בהם ניתן לקחת ביצית מופרית ובשיטות של מיקרו הזרקה ניתן להכניס את הגן שלנו הוא עובר אינטגרציה לגנים הביצית מושלת בעכברה עם הריון מדומה.

לעשות K.O. אנו יכולים לעשות על ידי ריקומבינציה הומולוגית או גן סלקטיבי שיעבור ריקומבינציה באזור בו רוצים לעשות K.O. לגן מסוים אנו עושים זאת ב – ESC (Embryonic Stem Cell) וכותצאה מהכלאה על עכברים ניתן לקבל את העכברים שבהם יש K.O. לגן שרצינו לבטל. יכולת הבקרה נעשית על ידי כך שמכניסים חיות טראנסגניות שבהם הגן X נמצא תחת פרומוטור שמופעל על ידי tat (טטרה ציקלון) וניתן לבצע ריקומבינציה כך שהגן יעבוד רק בנוכחות tat או רק בחוסר tat. למערכת זו קוראים tat on/off. כך לאחר קבלת הגן והכנסתו לחולה. החולה מקבל תרופה שמפעילה את הגן ושהוא מפסיק לקבל את התרופה הגן מפסיק לפעול.

### תרפיה גנטית באדם.

אנו מדברים על מחלות שבהם יש גן דפוק אחד שעובר בתורשה ומשפיע על סוג אחד של תאים כמו כן צריך שהגן יהיה ידוע ומשובט ועדיף שנדע מהם רגולציות של ביטוי גן זה. אדנוזין די-אמינוז הוא הראשון שטופל בתרפיה גנטית. כשיש פגם באנזים זה יש חשיפה מוגברת למחלות. היכולת שלנו לזהות את הגנים ולבודד אותם קורה כל הזמן על ידי פרויקט הגנום הבעיה העיקרית היא איך מחדירים אותו לאותה רקמה ספציפית שרוצים שהוא יבטא בה. אנו מדברים בעיקר על מערכות להובלת DNA וגם בקרת הביטוי של הגן שלא מספיק מפותחת באדם.

### מערכת הובלה להחדרת DNA.

יש 4 משפחות של אמצעים הראשונה זה Cellular Modalities שזה דרך פעולה רגילה של תאים. השנייה זה וירוסים רטרווירוסים ולנטי-וירוסים המשפחה השלישית הם וקטורים לא ויראליים שהם נשאים כימריים כמו ליפוזומים שבתוכם כלול DNA, פולי קטיונים הנאכלים על ידי תאים בגלל מטענם וכו' והמשפחה הרביעית היא חיסון גנטי.

המערכת של ה – Cellular Modalities בהם אנו לוקחים תאים שבהם אנו מכניסים את הגן פנימה ומחזירים את התאים בחזרה לחולה. אנו צריכים שהתאים הללו חוזרים שהם לא ידכאו. הטרנסקציה In Vitro היא יעילה בהרבה יותר משיטות אחרות (50 – 70 מהתאים מקבלים את הגן ומבטאים אותו) אנו משתמשים במרקרים סלקטיביים לקבל רק את התאים שקיבלו את הגן ומרבים אותם ומחזירים לחולה.

המערכות הללו מוגבלות למערכות המטופואזות לא ניתן לתקן אנזים בכבד, בלבב, במוח, בשריר וכו'. אלא רק עם הגן מיוצר על ידי מערכת המטופואטית. בשיטה זו ניתן לקחת לימפוציטים ספציפיים לתאים סרטניים להכניס להם גנים של TNF הגורם לאפופטוזיס של תאים סרטניים ולהחזיר לשולח וכך רואים פעילות עולה יותר שלהם נגד הסרטן. ניתן להגביר גם פקטורי קרישה מלימפוציטים במקום מסויות על ידי הוספת פקטור X. הרצפטור טרנספרין המכניס ברזל יכול להכניס קונוגטים המכילים DNA וקשורים לברזל וכך ה – DNA יכול להיכנס לתא ולהגיע לגרעין.

בטבע יש נשאים שבאמצעותם ניתן להכניס DNA לתוך תאים וכך הגיעו לשימוש בוירוסים, המכניסים את הגנים שלהם לשלנו הם גורמים למידע הגנטי שלהם לעבור אינטגרציה לגנום וכך ניתן להשתמש בהם להכניס גן באינטגרציה לגנים שלנו. כיום קשה לשלוט באזור האינטגרציה הרטרורוירוסים משתמשים ב – RNA שעובר רוורס טרנסקריפטאז לקבלת DNA עם LTR. ועובר אינטגרציה לגנום שם מקבלים mRNA שממנו מסונתזים חלבונים ויוצרים וירוסים. הגנים החשובים לכך הם gag, pol ו – env שמוציאים אותם ומכניסים גן שלנו. אנו מקבלים וקטור ואנו צריכים לארוז אותו בחלבוני וירוס מורוס אחר או תא אריזה. צריך שיישאר בוירוס שלנו את האזור שמסמן לאריזה psi.

אחת הבעיות הגדולות ביותר היא שהאינטגרציה רנדומאלית וכל עוד זה קורה באזור לא חיוני זה טוב אך שזה גורם לאקטיבציה של אונקוגן וגורמים לתהליך פתולוגי זה עיקר הבעיות בכל סוגי הוקטורים. ברטרורוירוסים קצב החלוקה מהיר מאד מה שיכול לגרום לשינוי במידע הגנטי עקב פולימורפיזם ומוטציה ואיבוד היכולת האפקטיבית שלהם.

גם באדנו וירוסים וגם ברטרורוירוסים יעילים רק לתאים מתחלקים כי אז הוא מיצר DNA והחומר הגנטי יכול להיכנס בקלות לגרעין כי הוא מופרד אך רוב התאים בגוף שלנו לא מתחלקים. הוירוסים יוצרים חלבונים חיוניים שהם גורמים לתגובה חיסונית נגד הטיפול ושוק ספטי ושוק אנפילפטי. ה – LTR יכול לגרום בעצמו לאפקטים לא רצויים על גנים הומאניים אחרים לא תמיד ניתן לבצע קורלציה עם התאים והם נותנים ספציפיות ייחודית לרקמה מסוימת (טרופיזם) והיא לא תמיד זו שאנו רוצים. האדנו וירוסים הם קצת יותר מתחכמים הם עוברים אינטגרציה קצת יותר מבוקרת חוץ מזה זה דומה לרטרורוירוס.

הרעיון הביא לוירוסים שמסוגלים להדבק גם תאים לא מתחלקים והם הלנטי וירוסים שביניהם האיידס. הוירוסים הללו מבוססים על רטרורוירוסים (MLV רטרורוירוס בעיקר שלא משפיע באדם) אך הם מדביקים את כל סוגי התאים גם הלא מתחלקים וזה על ידי כך שהם מכניסים את הגנים שלהם לתוך הגרעין ולא צריך את החלוקה.

מנגנון זה של Nuclear Import מקנה לוירוסים אלו את היתרון אנו עוצרים את מחזור התא באופן מלאכותי ב –  $G_0$  ורואים שגם במצב זה הוירוסים הללו מדביקים את זה ראו בתאי CD4 שעברו Grow Arrest הוירוסים הללו מכילים שני חלבונים שהם מטריקס ו – Vpr והם עוברים אינטראקציה עם מנגנון ה – Nuclear Import ואז יש טרנספורט אקטיבי דרך ממברנת הגרעין של Pre Integration Complex דרך ה – Pores לתוך הגרעין.

הוקטור נעשה על ידי הסרת הגנים של gag, pol ו – env והפולימראז נקבל HIV המכיל רק את האלמנטים הנחוצים לאינטגרציה. ניתן לראות בתוצאות גם לאחר שנה מביצוע של טרנסדוקציה כי יש כניסה לגנום והישארות שם. כשאנו מדברים על תרפיה גנטית אז אנו צריכים להחליט אם אנו הולכים אזורית או במערכת סיסטמית בה ניקח חולה נזריק גן שיעבור Targeting לבד ויגרום לתיקון או באינהלציה של הוירוס בנשימה.