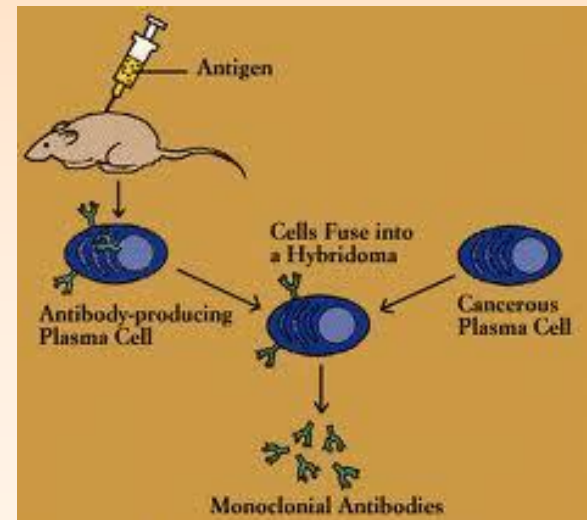
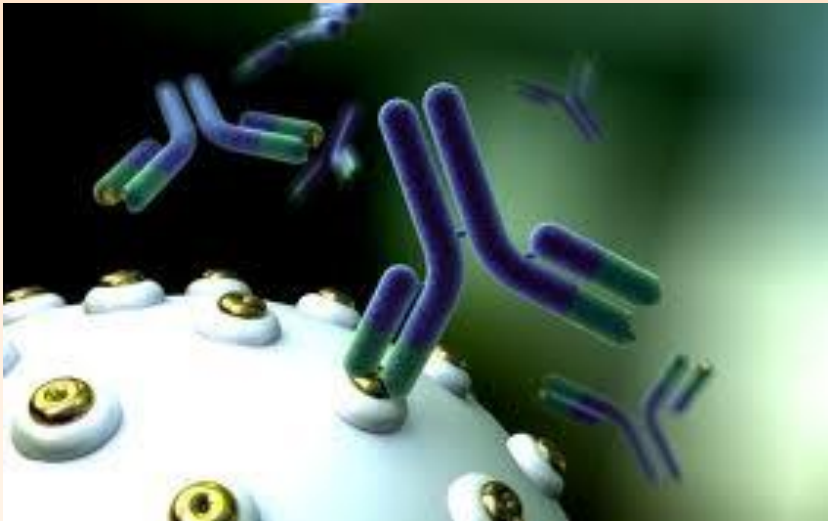


# PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK



**Antigenový determinant aktivuje jeden klon buněk**

**Klon buněk: syntetizuje jeden druh  
imunoglobulinových molekul  
(stejný alotyp, idiotyp i podskupina)  
(třída a podtřída se může měnit)**

**Variabilní domény mají stejnou sekvenci AK**

**Jednotlivec se setkává s mnoha antigeny,  
vzniká mnoho klonů buněk produkujících imunoglobuliny  
různé idiotypy  
heterogenost imunoglobulinů**

**Nekontrolované množení klonu plazmatických buněk,**  
které produkují imunoglobuliny:  
přeměna plazmatické buňky na nádorovou  
Výsledek:   mnohopočetný myelom  
                  Waldenströмова makroglobulinemie

**Klon plazmatických buněk s maligním růstem  
produkuje jeden typ imunoglobulinů ve velkých množstvích.  
(mají homogenní strukturu)  
Lze je lehce izolovat (monoklonální Ig) a analyzovat primární  
strukturu Ig.**

**V minulosti** monoklonové Ig patologické proteiny  
**paraproteiny.**

**Dnes**

- ✓ nejedná se o patologické Ig  
(struktura není změněna)
- ✓ normální produkty (porucha v regulaci) tvoří se  
v nesmyslném množství.

Monoklonové imunoglobuliny vyvolávají  
**monoklonové gamapatie** – onemocnění:

- benigní
- maligní (zhoubný) průběh

## Monoklonové gamapatie:

- ✓ **mnohopočetný myelom**
- ✓ **Waldenströмова makroglobulinemie**
- ✓ **choroby z těžkých řetězců**

## Mnohopočetný myelom

**zhoubný nádorový růst plazmatických buněk v kostní dřeni s nadměrnou tvorbou IgG, IgA, IgD a IgE monoklonového typu**

**Myelomové imunoglobuliny tvoří:**

- **celé molekuly**
- **lehké řetězce (Benceho-Jonesovy proteiny)**

## Waldenströмова makroglobulinemie

je zhoubný růst lymfoidních buněk, které tvoří monoklonální IgM

## Choroby s chybnými těžkými řetězci

- ✓ v krevním séru řetězce H,
- ✓ nejsou většinou úplné, chybí jim některá doména (nejčastěji variabilní).
- ✓ nejsou to produkty odbourávání Ig, syntetizuje je klon plazmocytů s maligním růstem
- ✓  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$  chybné řetězce

**Myelomové imunoglobuliny** u člověka i zvířat (myš, potkan, slepice)

**Monoklonální** protilátky **homogenní**  
(chemické individuum).

**Polyklonálních** protilátky = **heterogenní** směs.

**Při imunizaci zvířat** antigenem vznikají  
polyklonální protilátky:

- ✓ antigen má víc jak jednu determinantní skupinu
- ✓ směs protilátek
  - rozdílnou afinitu
  - různé biologické funkce
  - kvalita protilátek ve dvou různých laboratořích je různá

## **Spontální monoklonální protilátky**

**(příčina gamapatií)**

**nelze použít**

**antigen (přesněji epitop) není znám.**

**zájem o umělou přípravu monoklonálních protilátek**



## První pokusy přípravy monoklonálních protilátek

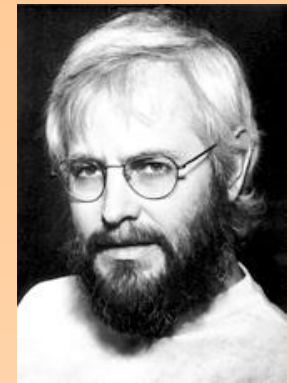
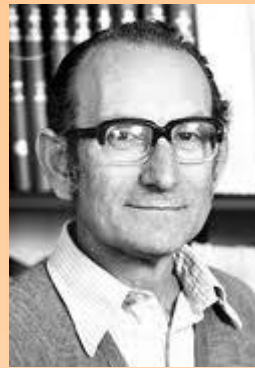
- ✓ **Antigen s jedním determinantem v mnoha kopiích.**
- ✓ **Kultivace velmi malých kousků sleziny z imunizovaných zvířat.**  
**Předpoklad:**  
**zachytí se jen jeden klon buněk,**  
**produkce požadované protilátky**  
**malé výtěžky (buňky omezený růst, hynou).**

## Objev Köhlera a Milsteina 1975

(1984 Nobelova cena)

Základem: spojení - buněčná fúze

**myelomových** buněk kultivovaných *in vitro* se slezinovými **lymfocyty** z myši imunizovaných požadovaným antigenem.



Vznikají: hybridové buňky, tvořící **hybrid-myelom HYBRIDOM**

Hybridom má vlastnosti obou rodičovských buněk:

- ✓ Schopnost produkovat protilátky pro použitý antigen (slezinové buňky).
- ✓ Schopnost dělit se po neomezený počet generací (nesmrtelnost myelomových buněk).

## Hybridomové buňky

- ✓ mohou se klonovat (jedna buňka se rozmnoží na mnoho identických buněk)
- ✓ klon produkuje velké množství stejných protilátek proti jednomu determinantu
- ✓ hybridomové kmeny se mohou uchovávat po neomezenou dobu ve zmrazeném stavu

## Rozmnožování:

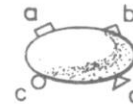
- ✓ *in vitro* (v tkáňové kultuře)
- ✓ *in vivo* (po injekci vhodného experimentálního zvířete)

# Rozdíly mezi monoklonálními a polyklonálními protilátkami

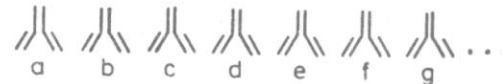
A

## polyklonální Ab

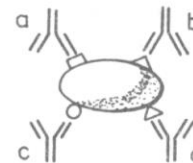
ANTIGÉN



SÉROVÉ  
PROTILÁTKY



VYTVORENÝ  
IMUNOKOMPLEX



B

ANTIGÉN

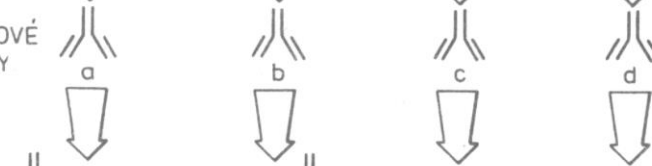


## monoklonální Ab

SELEKTOVANÉ  
(VYBRANÉ)  
HYBRIDÓMY



MONOKLONOVÉ  
PROTILÁTKY

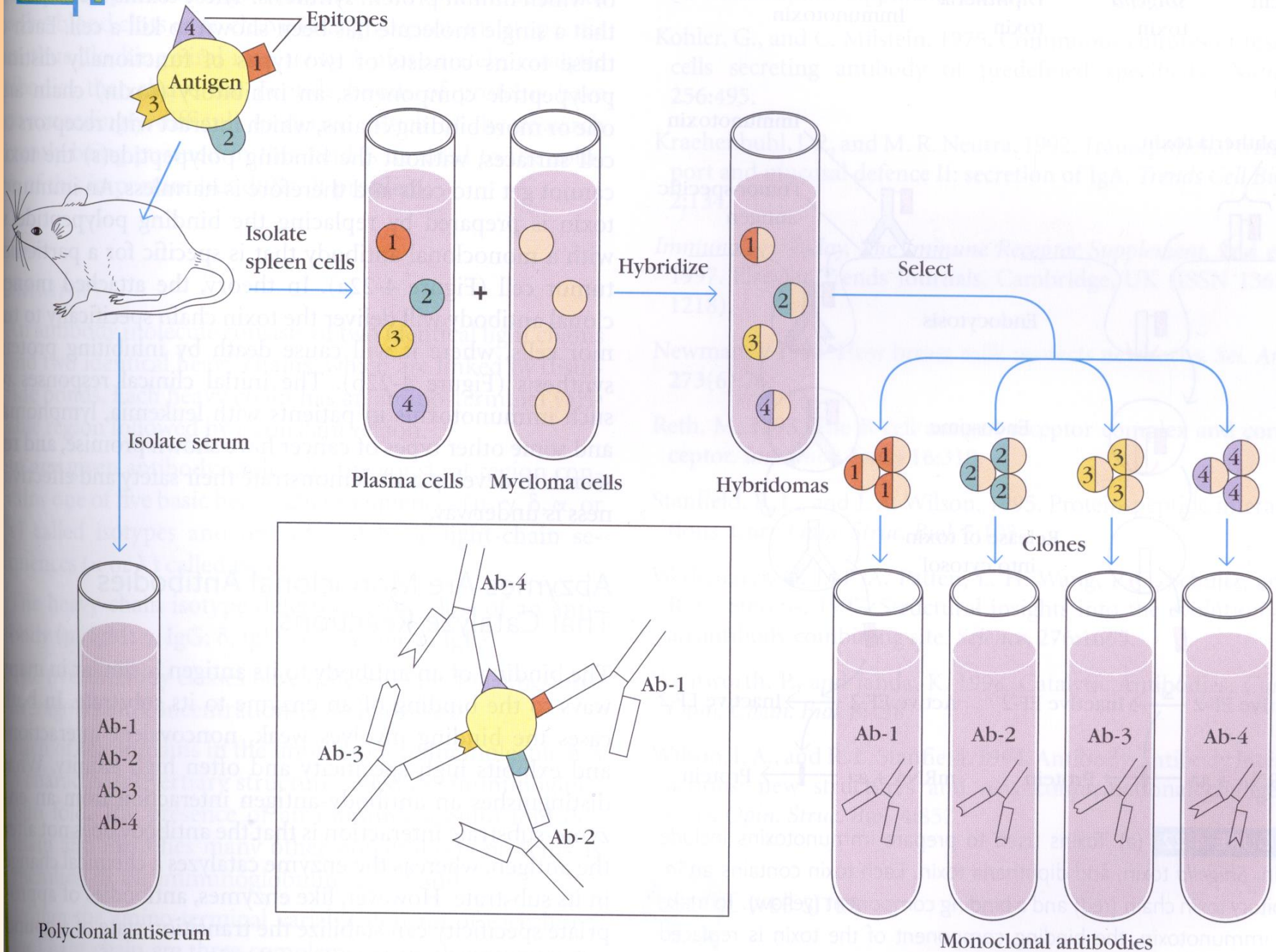


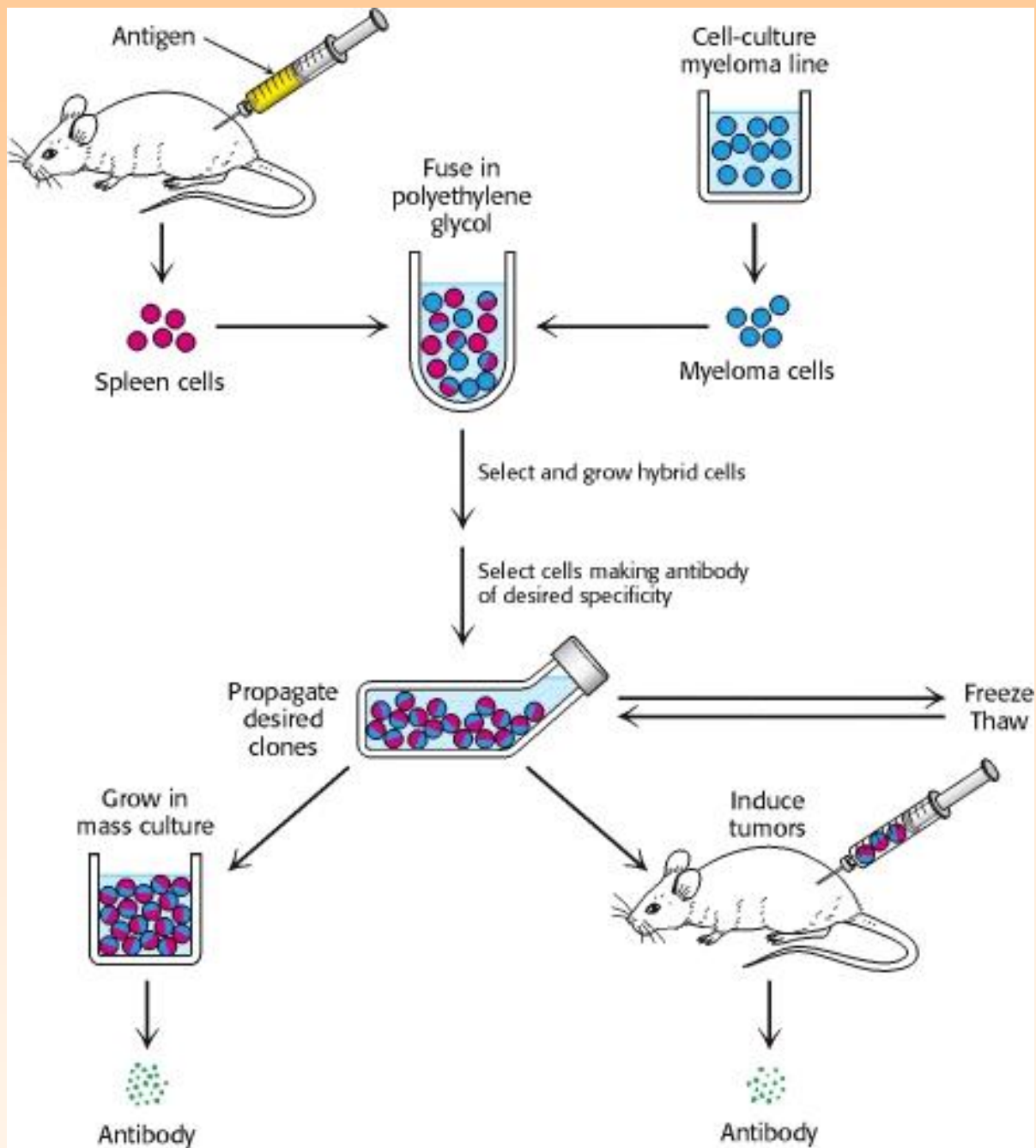
VYTVORENÝ  
IMUNOKOM-  
PLEX





# HYBRIDIZING CONCEPTS







# Postup při přípravě monoklonálních protilátek

- ✓ **Fúze slezinových buněk** z imunizovaného zvířete s **myelomovými buňkami** (nádorové buňky), pěstovanými v tkáňové kultuře.
- ✓ **Selekce** vzniklých **hybridomů** v HAT mediu (hypoxantin, aminopterin a thymin).
- ✓ Kultivační medium s hybridomy se rozpipetuje.
- ✓ Vyšetření kultivačního media na přítomnost protilátek (pozitivní kultury- část zamrazit a část znovu klonovat).
- ✓ Několikrát opakovat, pozitivní kultury se rozmnoží a část zůstane zamražená pro další použití.

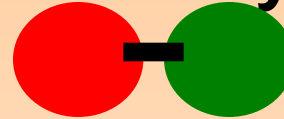
## Požadavky na myelomovou linii

- ✓ **Schopnost trvalého růstu  
(*in vitro* i *in vivo*).**
- ✓ **Nesmí produkovat vlastní myelomové protilátky.**

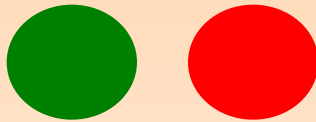


## Po fúzi se v médiu nachází:

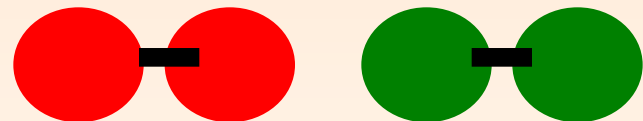
hybridom: myelomová buňka-lymfocyt



nespojené buňky



stejnými buňkami  
lymfocyt-lymfocyt  
myelomová buňka - myelomová buňka



myelomová buňka



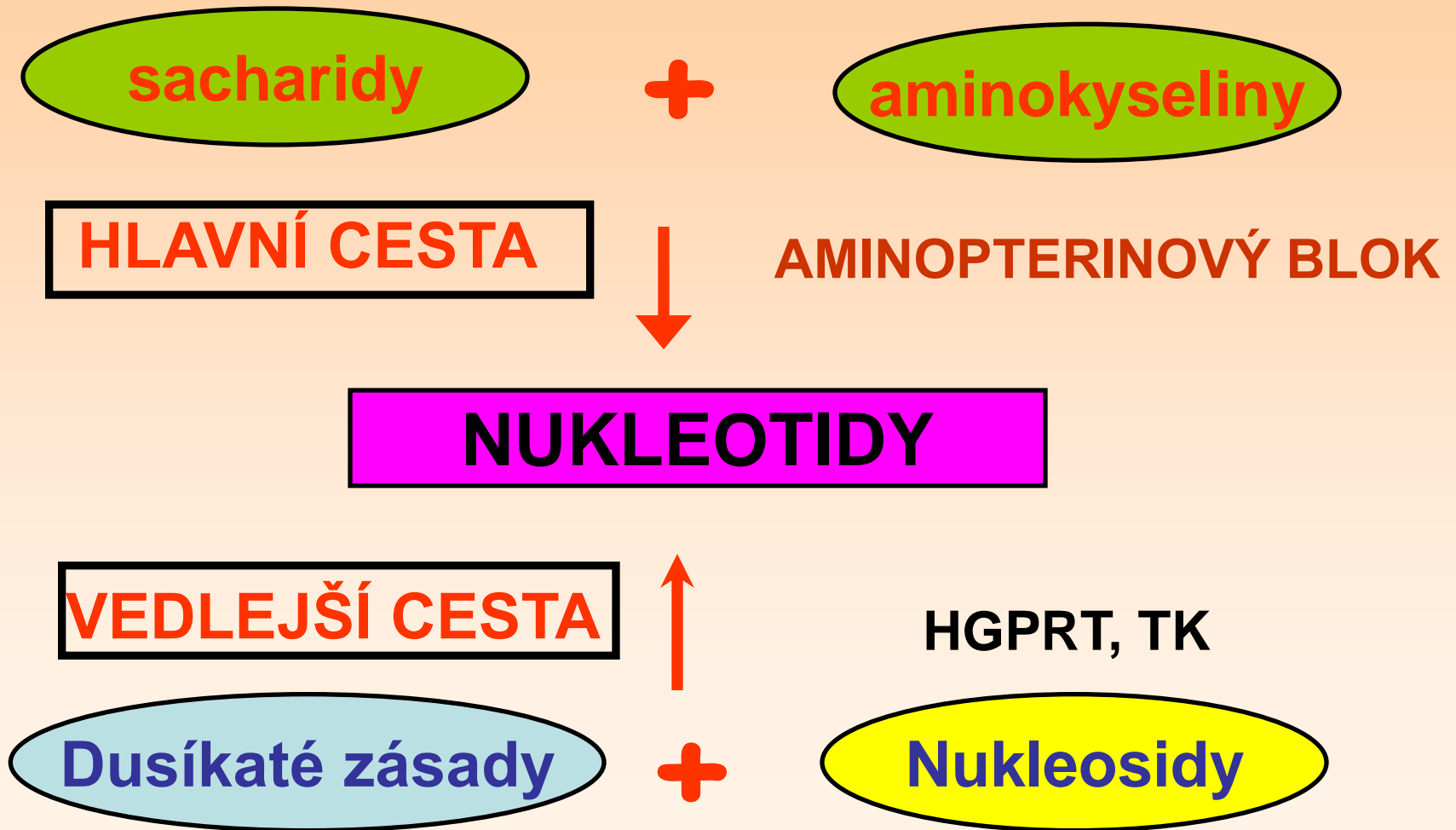
lymfocyt

## Metoda založená na enzymových defektech: (chybění důležitých enzymů)

- ✓ V buňkách kultivovaných *in vitro* lze navodit určité enzymové defekty.
- ✓ Buňky se enzymovými defekty nejsou schopné růst v médiích, které obsahují selekční komponenty.
- ✓ Hybridní buňky mohou nepřítomnost potřebného enzymu v jedné buňce kompenzovat jeho přítomností v partnerské buňce.
- ✓ Na selekci hybridomů se využívá **vynechání některých enzymů syntetizujících nukleotidy.**

Buňky syntetizují nukleotidy dvojným způsobem:

- ✓ **hlavní cesta** (de novo)
- ✓ **vedlejší cesta** (hotové purinové báze a nukleosidy)



HGPRT= hypoxantin(guanin)-fosforibozyltransferasa; TK=thymidinkinasa

Dusíkaté zásady

Nukleosidy

Nukleotid

hypoxantin

HGPRT

Inosin-5' -fosfát

5' -fosforibozyl-  
1 -pyrofosfát

guanin

Guanosin-5' -fosfát

VEDLEJŠÍ CESTA

thymin

TK

5' -fosforibozyl-  
1 -pyrofosfát

Thymidin-5' -fosfát

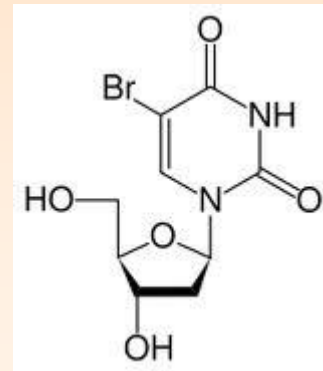
HGPRT= hypoxantin(guanin)-fosforibozyltransferasa; TK=thymidinkinasa

## Zamezení syntézy nukleotidů vedlejší cestou:

- ✓ Mutanty buněk, kterým chybí HGPRT se získají: kultivace myelomových buněk s **8-azaguaninem** (analog guaninu), v buňkách s funkční HGPRT se zabudovává do DNA (čímž se zničí genetická informace) V přítomnosti 8-azaguaninu přežívají jen mutanty deficitní na HGPRT.

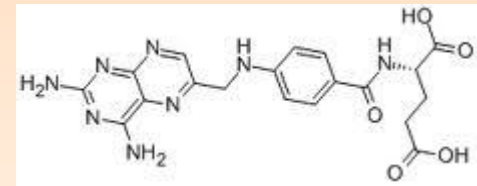


- ✓ Kultivací s analogem thymidinu **5-brómdeoxyuridinem** myelomové linie deficitní na TK.



## Zamezení syntézy nukleotidů hlavní cestou:

- ✓ Při normálních kultivačních podmínkách se syntetizují nukleotidy hlavním způsobem a nepřítomnost enzymů nevadí.
- ✓ Buňka s deficitem HGPRT nebo TK kultivuje přítomnosti **aminopterinu** (inhibitor hlavního způsobu) nastane její smrt. Přežít může jen když se spojí s buňkou, která kompenzuje enzymový deficit.



**HLAVNÍ CESTA**

**HAT-medium (kultivační medium)**  
(hypoxantin, thymin a aminopterin)  
ke kultivaci buněk po hybridizaci,  
přežijí jen hybridomy

**Hynou:**

- ✓ nezfúzované myelomové buňky  
myelomová-buňka- myelomová buňka  
(protože nemohou syntetizovat DNA)
- ✓ lymfocyty  
hybridy lymfocyt-lymfocyt  
(v tkáňové kultuře nedělí,  
mají jen krátkou životnost)



❖ Technologie přípravy monoklonálních protilátek byla omezená jen na přípravu **myších protilátek**. Jen myelomové linie myší.

❖ Mezidruhové fúze ve většině případů nebyly úspěšné.

Mezidruhovým spojením vzniká ztráta vícerých chromozomů jednoho z partnerů, včetně chromozomů nesoucích geny pro imunoglobulinové molekuly.

❖ Dnes už existují myelomové linie pro přípravu potkaních, lidských.

(problém imunizace a získávání slezinových buněk lidských)



## Imunizace dárce slezinových buněk má dva významy:

- ❖ zvyšuje se počet slezinových buněk, které produkují protilátky
- ❖ indukuje dělení a diferenciaci odpovídajících buněčných klonů do stádia, kdy po spojení s myelomovými buňkami umožňuje vznik hybridomů.

## Dva způsoby imunizace

### ✓ Imunizace *in vivo*

zásady imunizace a imunizační schéma stejné jak při přípravě konvenčních protilátek

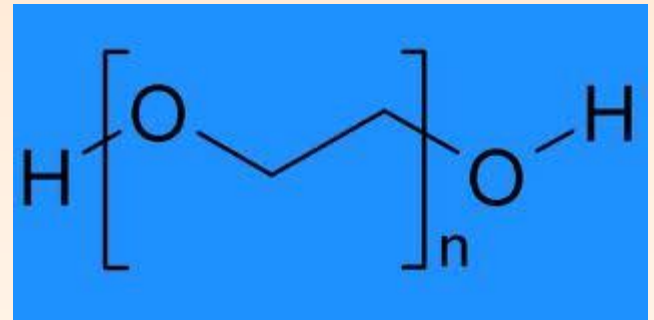
### ✓ Imunizace *in vitro*

kultivace slezinových buněk s antigenem  
(technika má však jistá omezení)

# Fúzogeny

Za normálních podmínek vzniká fúze lymfocytu s myelomovými buňkami jen vzácně. Musí se přidávat látky -fúzogeny.

- inaktivovaný virus SENDAI  
Köhler a Milstein
- **polyethylenglykol (PEG)**  
 $M_r = 2000-6000$



**Hybridní buňky v HAT mediu se rozpipetují do jamek kultivačních destiček:**

## **Identifikace klonů hybridních buněk**

- ✓ **Identifikace stovek až tisíců kultur**
- ✓ **Kultura s určitou protilátkovou specifitou**
- ✓ **Stanovují se v mikromnožství, automatizace (ELISA).**
- ✓ **První klonování bezprostředně po fúzi.**
- ✓ **Buňky s požadovanými protilátkami-opakovaně klonovat**



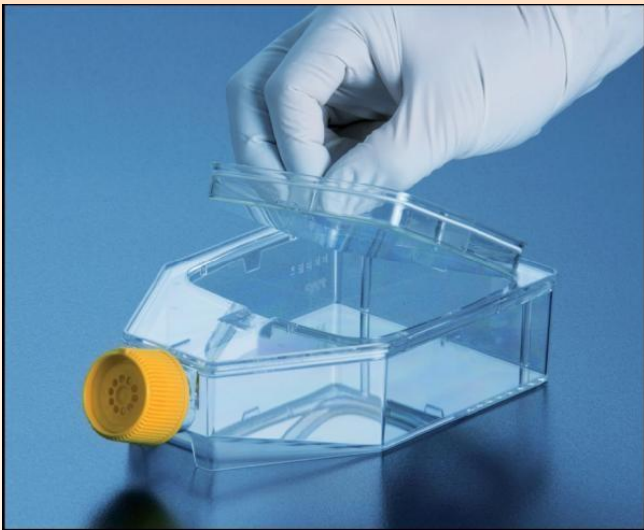
## Dva způsoby klonování:

- ✓ Ředěním se buňky nařadí tak, aby jedna kultura obsahovala průměrně méně jak jednu buňku.
- ✓ V polotekutých médiích připravuje se z agaru nebo agarósy.

## Rozmnožování hybridomů

za účelem produkce monoklonálních protilátek

- ✓ *in vitro* v kultivačním médiu
- ✓ *in vivo* v ascitické tekutině myši



## in vitro

**Kultivace v bezsérových (syntetických) médiích zjednodušuje izolaci čistých imunoglobulinů. Z 1 ml kultivačního média lze získat 10 až 200  $\mu\text{g}$  monoklonálních protilátek.**

## in vivo

- ✓ získání většího množství monoklonálních protilátek
- ✓ ascitická (břišní zápalová) tekutina nebo sérum myši, kterým se injektovaly hybridomové buňky.
- ✓ syngenní myši
- ✓ 3 až 15 ml ascitické tekutiny (2 až 20 mg monoklonálních protilátek/ml)

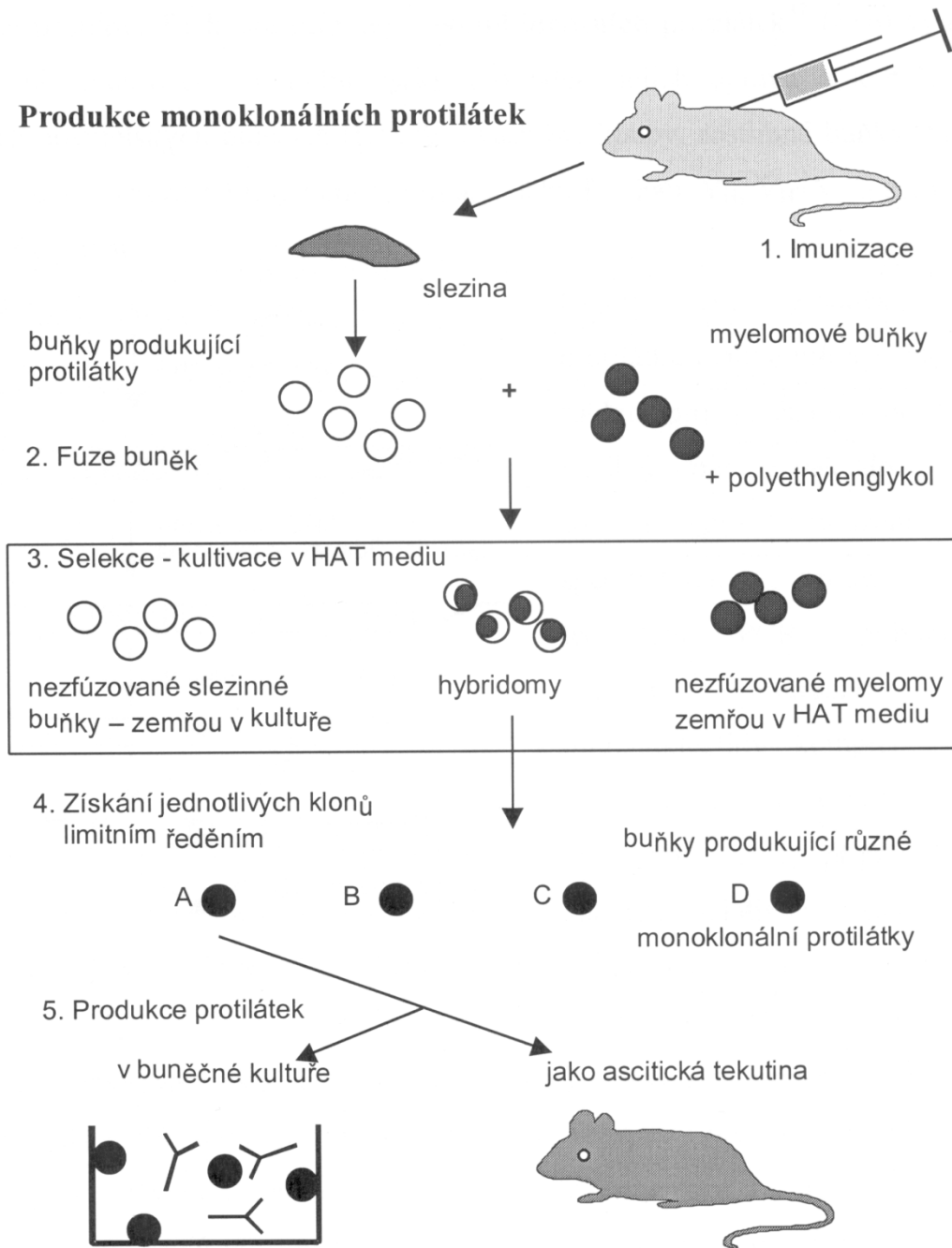
T-buňky- hybridomy = produkty imunoregulační a výkonné lymfocyty



## Hybridomová technologie

- ✓ získání jiných biologických látek
  - enzymy
  - hormony
- ✓ z běžných přírodních zdrojů se izolují
  - v nedostatečném množství
  - s nedostatečnou čistotou
- ✓ buňka produkující požadovanou látku se spojí s vhodnou nádorovou buňkou

# Produkce monoklonálních protilátek



# Vlastnosti monoklonálních protilátek

**V zásadě se neodlišují od polyklonálních**

## **výhody**

- chemická individua
  - jsou monospecifické a účinné v nižších koncentracích
  - lze je připravit v neomezeném množství
  - antigen nemusí být přečištěný
- 
- ✓ neprecipitující protilátky
  - ✓ netvoří precipitující imunokomplexy

**Protilátka se navazuje na jeden antigenový determinant, takže se nemůže tvořit trojrozměrná mřížková struktura.**

## Využití monoklonálních protilátek

- ✓ **Izolační a analytické metody**
- ✓ **Problémy v biochemii a molekulární biologii**
- ✓ **Zkoumání povrchových antigenů buněk  
(diagnostika virů, bakterií a parazitů)**
- ✓ **Klinická biochemie- antigeny typické pro nádory**

## **Izolační a analytické metody**

- **mAb na tuhém nosiči: imunoafinitní chromatografie**
- **RIA a EIA s mAb**
  - **jednotná afinitní konstanta,**
  - **zkrácení času analýzy**
  - **lepší reprodukovatelnost**
  - **žádné křížové reakce**
  - **nejsou falešné výsledky**
  - **analytická přímka v širším rozsahu koncentrace**

## **Řešení problémů v biochemii a molekulární biologii**

- **enzym-zymogen (různé epitofy)**
- **struktura biopolymerů (rozdíly v AK, změna konformace)**

# Zkoumání povrchových antigenů buněk

cytoplazmatická membrána znaky: biologický druh  
jedinec  
tkáň  
buňka

rozlišení T a B-buněk, subpopulace buněk, antigeny nádorů  
(AIDS: ↓ T-buněk, autoimunita: ↓ konc. tlumivých buněk)  
diagnostika onemocnění (virové, bakteriální, parazitní)

## Klinická biochemie

určení antigenů různých nádorů

lokalizace nádorů v organismu

nosiče cytotoxických léčiv

mAb: karcinoembriový antigen(CEA),  $\alpha$ -fetoprotein,  
 $\beta_2$ -mikroglobulin, feritin (běžně se vyskytují konc. =nádor  
konjugace mAb s radioizotopy lokalizace nádoru

# PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK PRAKTICKY



**Myš imunizovaná,  
připravená k odběru  
sleziny pro získání  
B-lymfocytů**

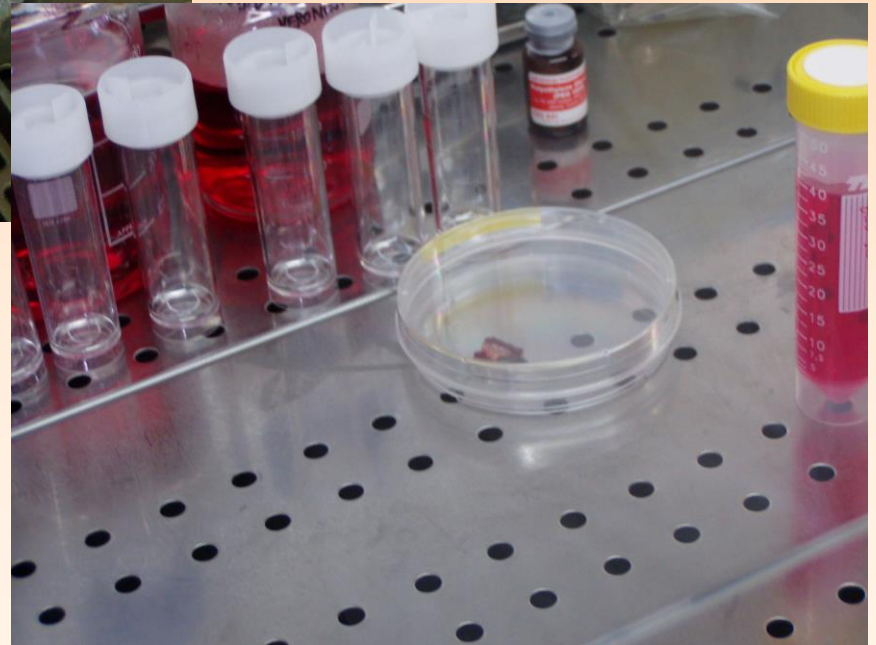
**LRL PŘF UP**







**Separace sleziny**





# Získání slezinných buněk B-LYMFOCYTY



bezserové  
médium





**Odpipetování vyplavených B-lymfocytů ze sleziny do centrifugační zkumavky. Následuje centrifugace.**



**Odsátí supernatantu. Buňky jsou připraveny pro fúzi s myelomovými buňkami.**





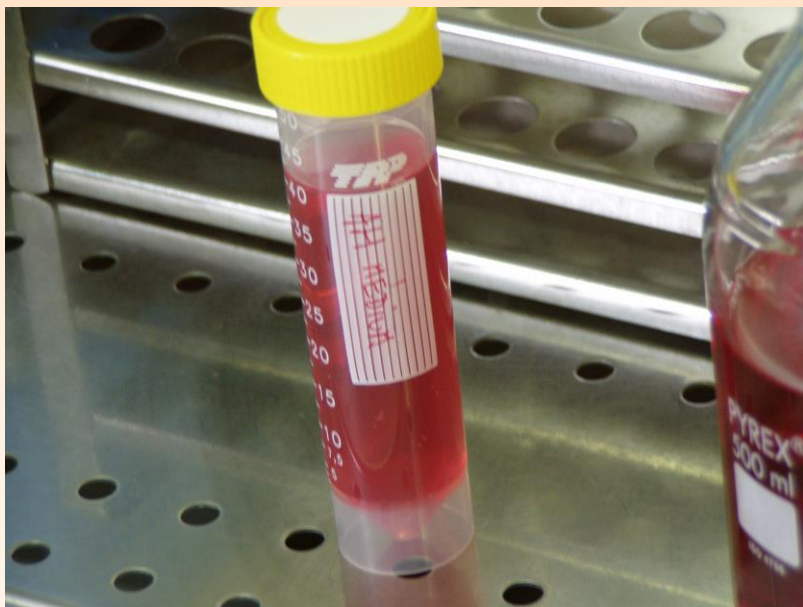
**Myelomové buňky.  
Centrifugace a odsátí  
supernatantu.  
Spojení myelomových  
buněk s B-lymfocyty**



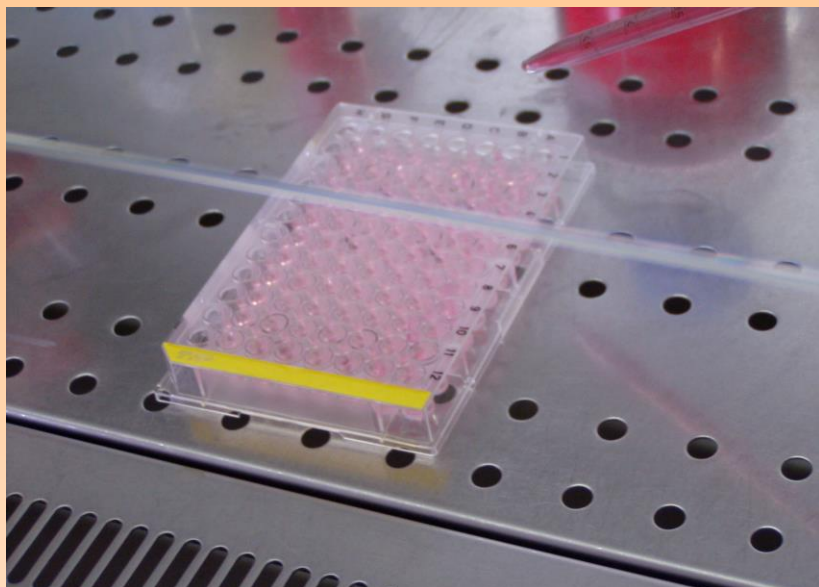
# Fúze v prostředí polyethylenglykolu 1000.



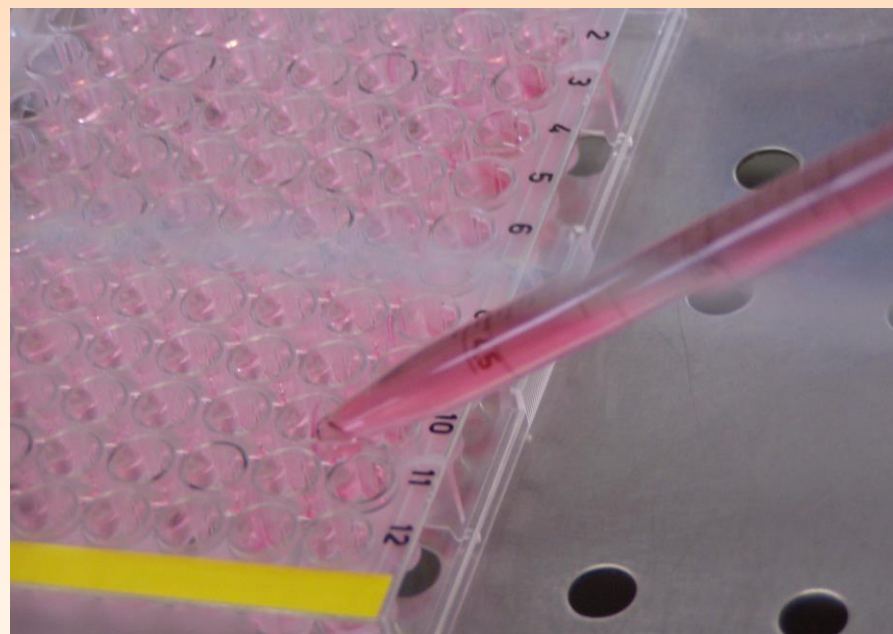
**Růst buněk v AH-médiu.  
Rostou jen hybridomy B-lymfocyt-myelomová buňka.**

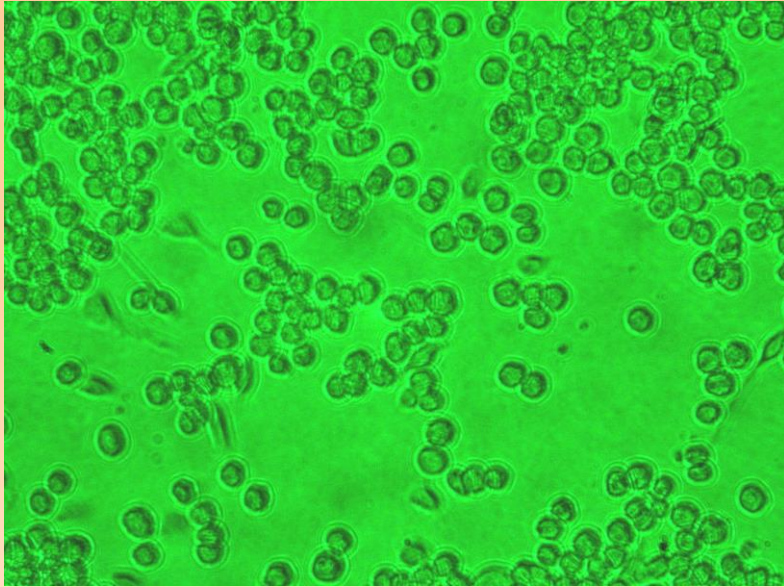




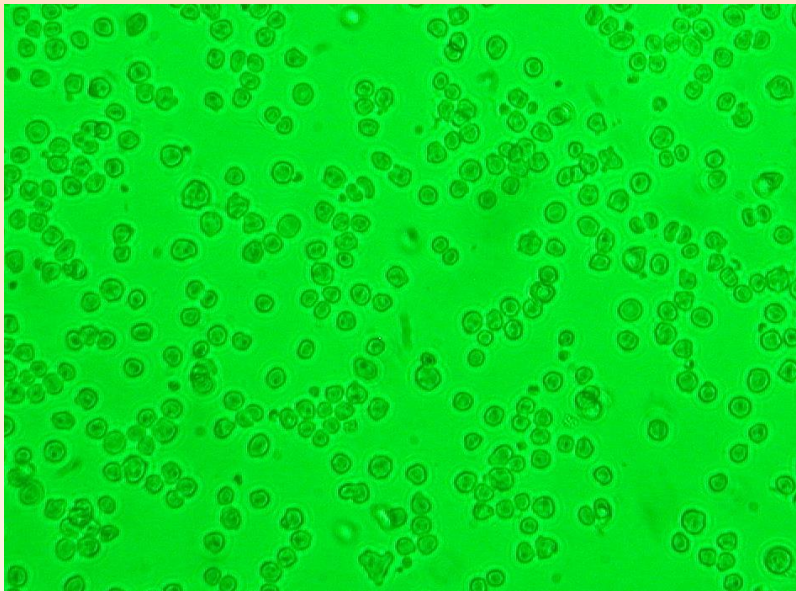


**Rozpipetování po fúzi  
do 10 mikrotitračních destiček.**





**Hybridomy**



**SP2- buňky  
myelomové buňky**