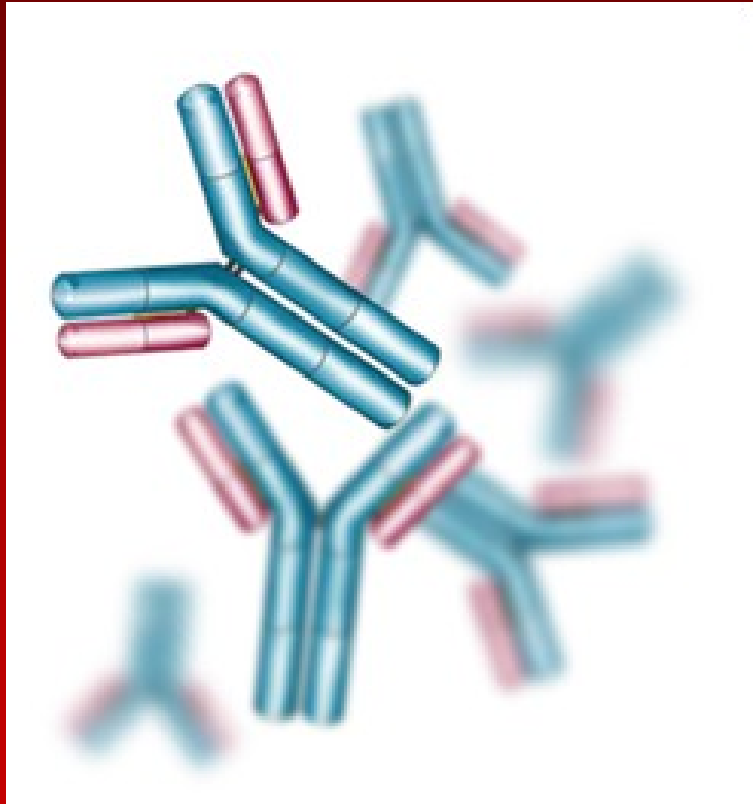


PRAKTIKUM č.2



ÚKIA, LF MU, Mgr. Olga TICHÁ

PROTILÁTKY

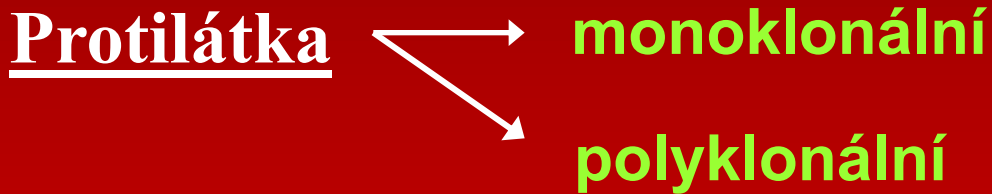
- protilátky jako základní reagens při imunologických metodách
- základní charakteristika reakce Ag – Ab

Obečné princípy reakce Ag - Ab

Antigen – látka schopná vyvolat imunitní reakci



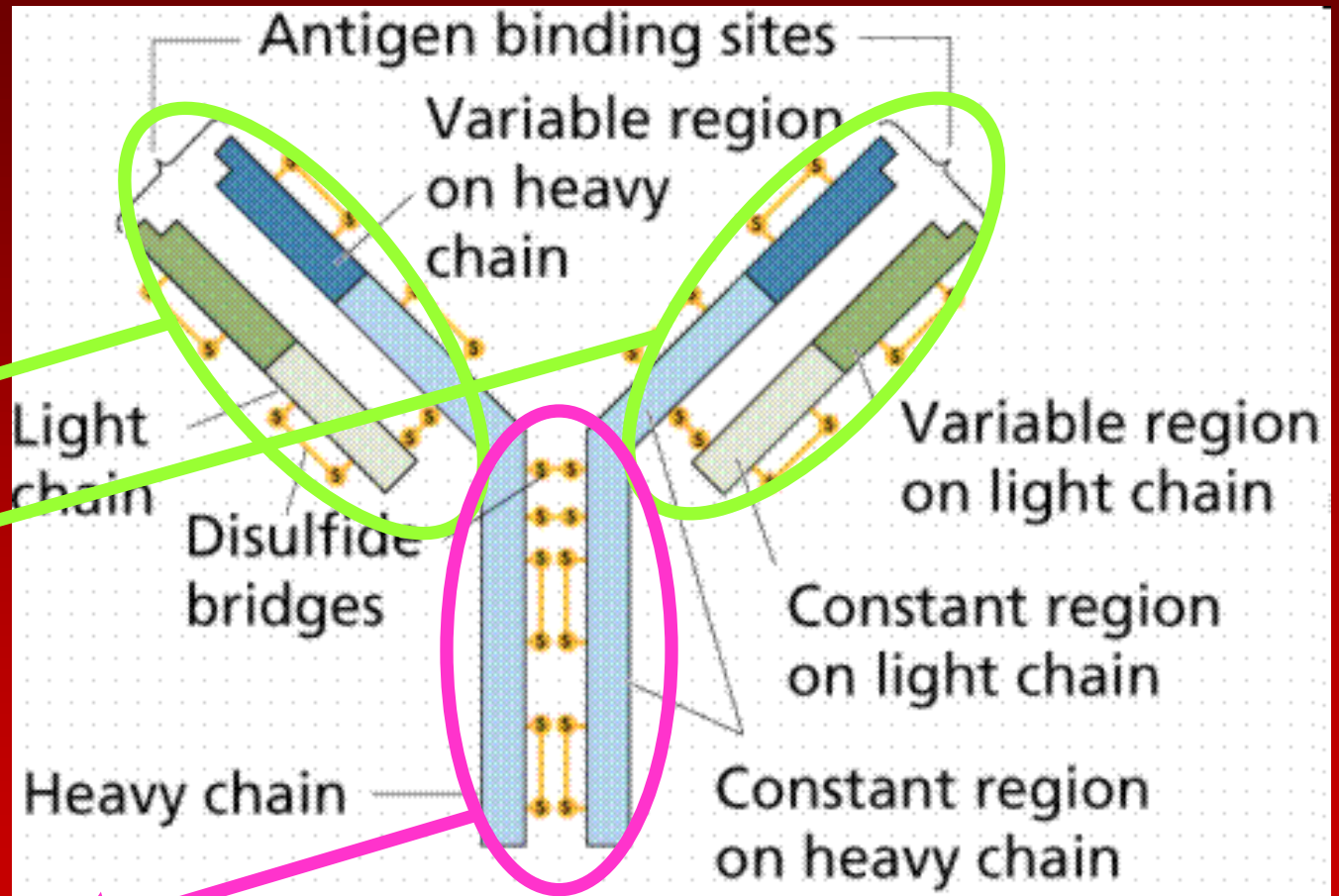
vazebné místo: EPITOP (antigenní determinanta)



vazebné místo: PARATOP

AFINITA (epitop s paratopem) a **AVIDITA**

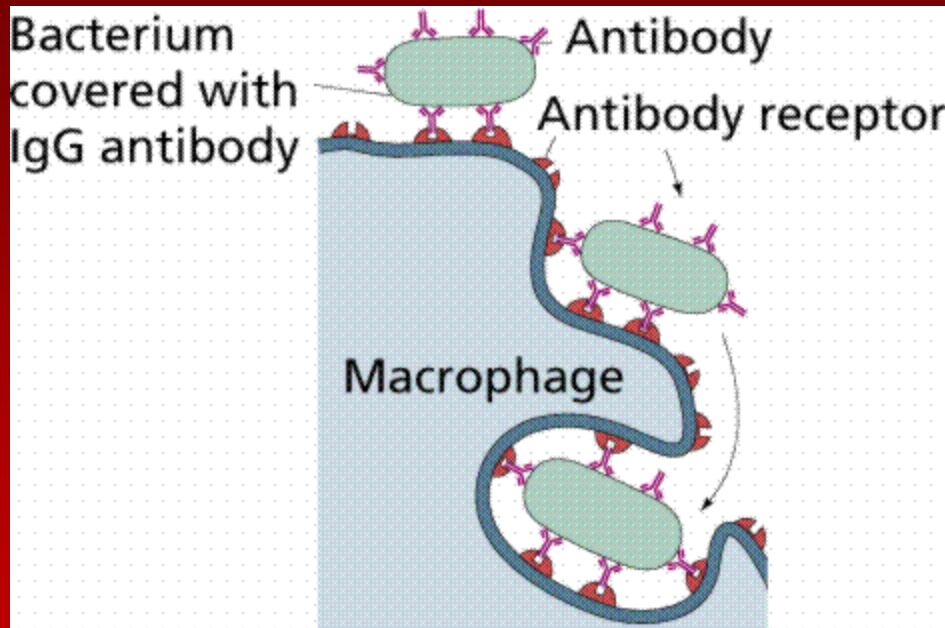
PROTILÁTKY (Ab)



Fab

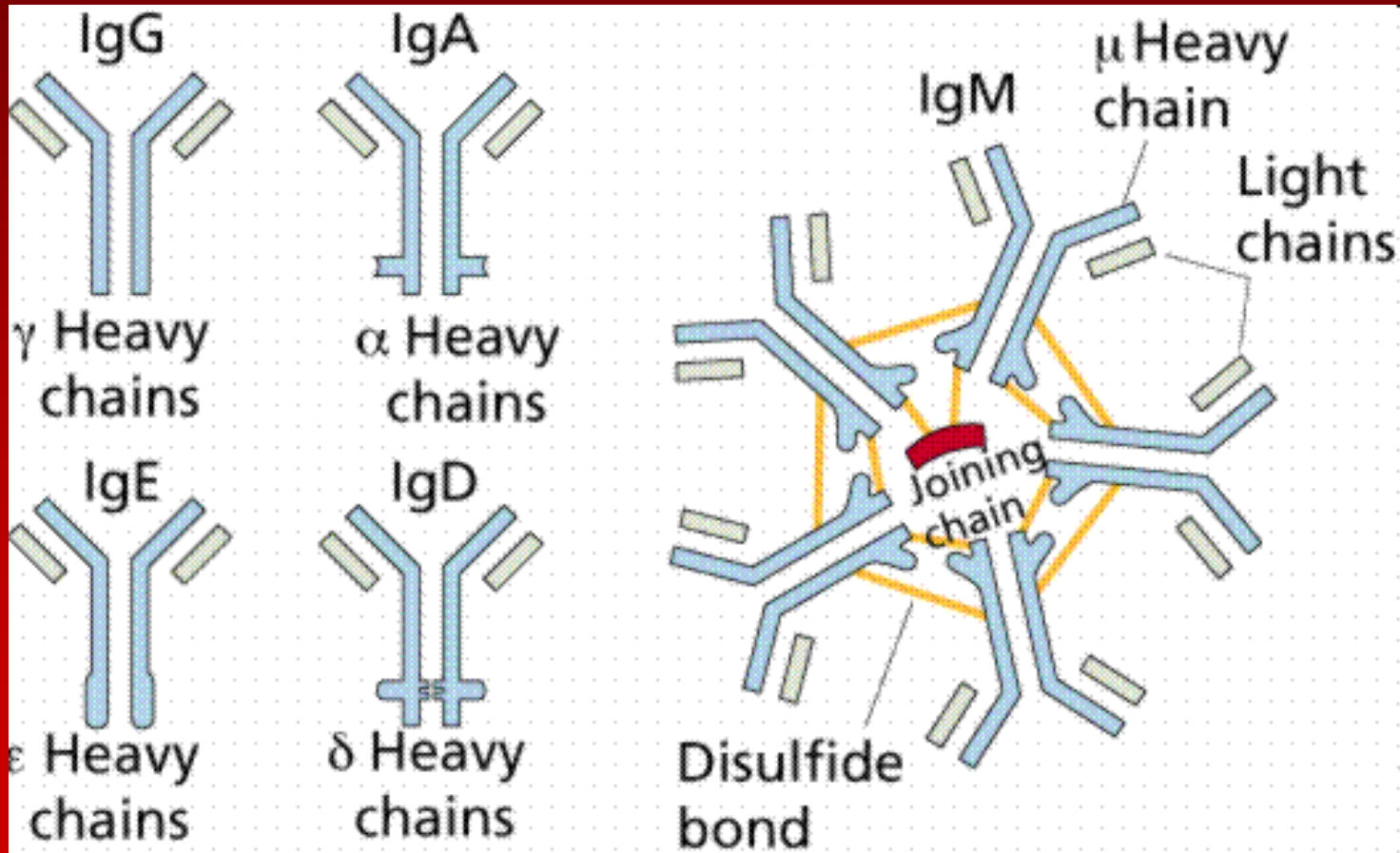
Fc

Rozeznání Fc Ab makrofágem

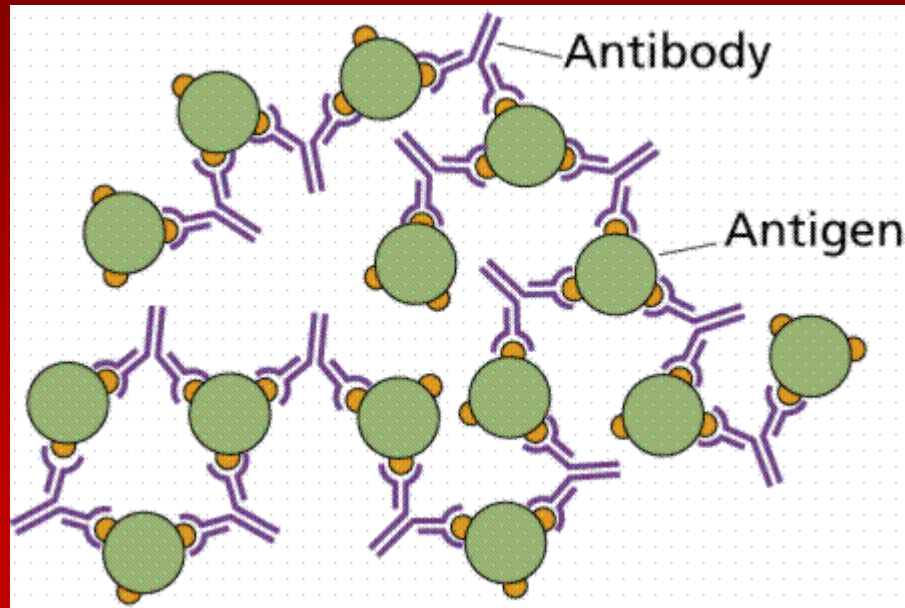


TŘÍDA PROTIŁÁTEK

- dle typu konstantního řetězce



Interakce volného Ag s volnými Ab

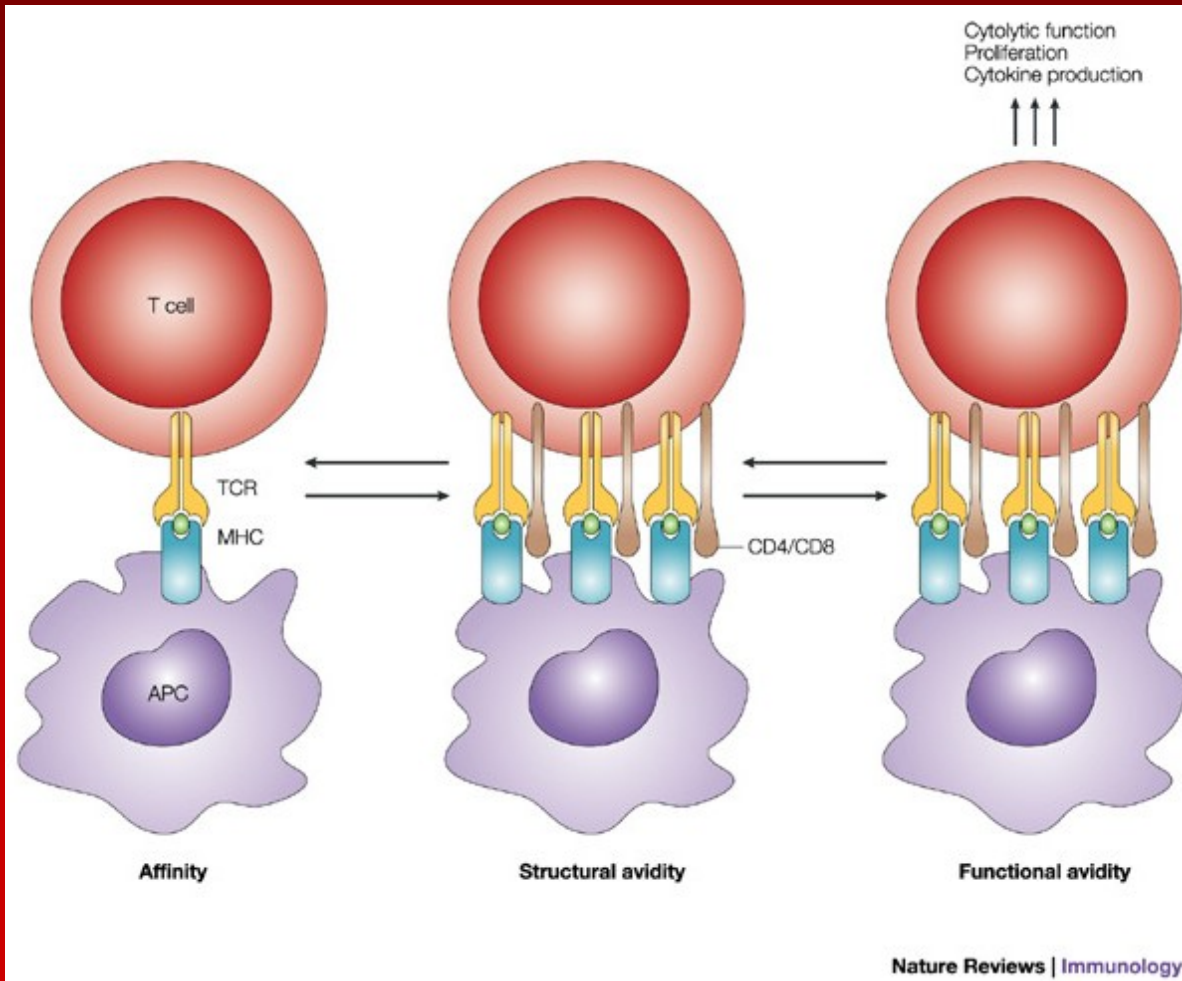


AFINITA

- vazba Ag-Ab zahrnuje vodíkové můstky, iontové vazby, hydrofóbní interakce, van der Waalsovy síly
- dána velikostí síly mezi jedním vazebným místem Ab a jedním epitopem Ag

AVIDITA

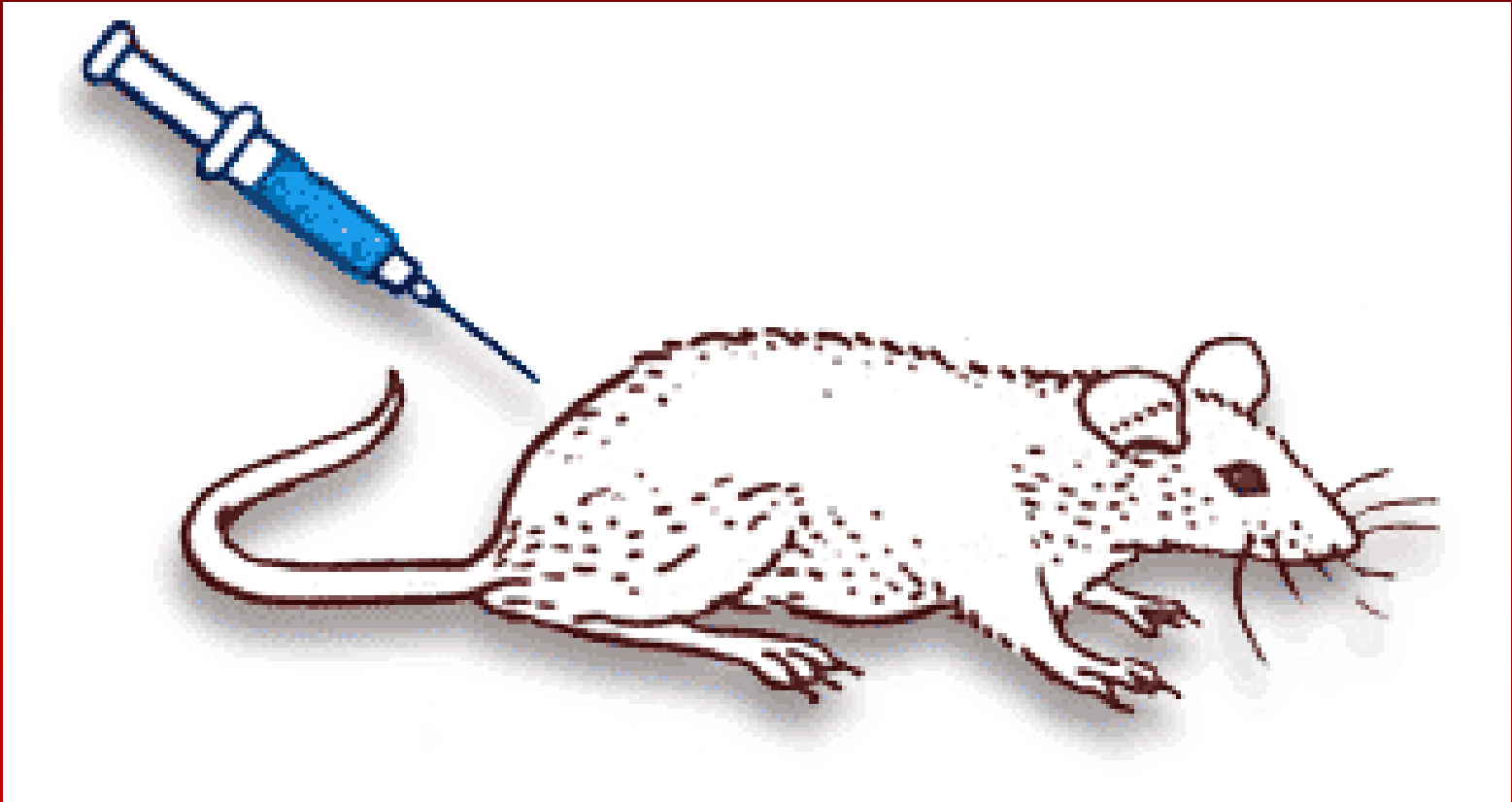
- dána vícenásobnou interakcí mezi multivalentní Ab a Ag (opakovaný epitop na povrchu)



POZOR!

**Antigenem může být i
protilátka!!!**

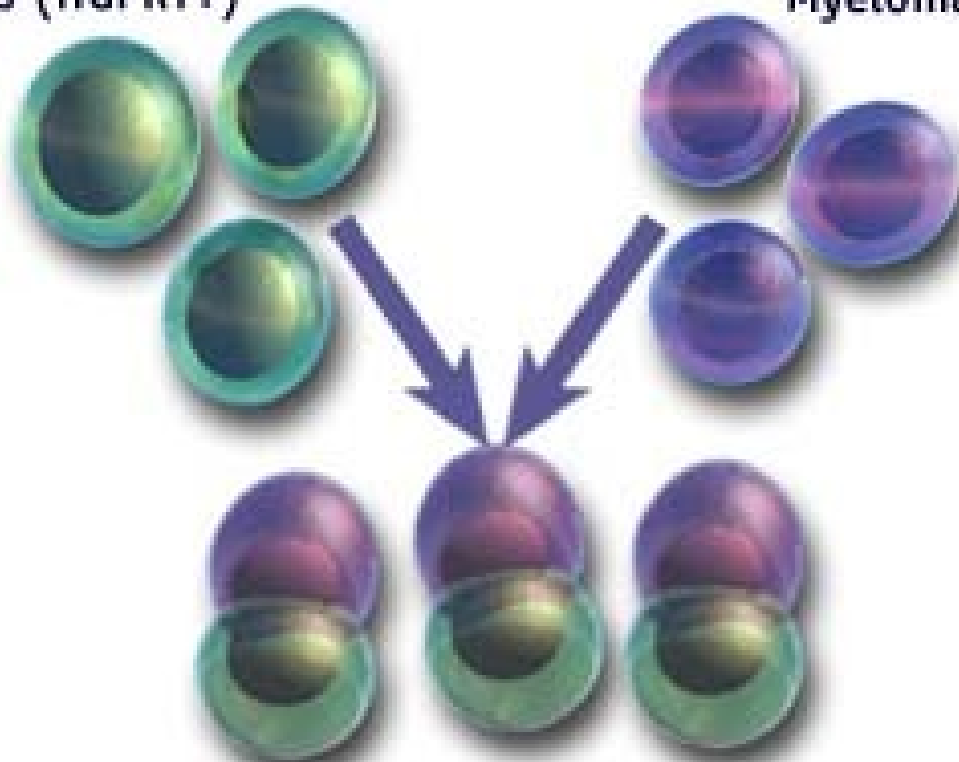
PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK I.



MAb II.

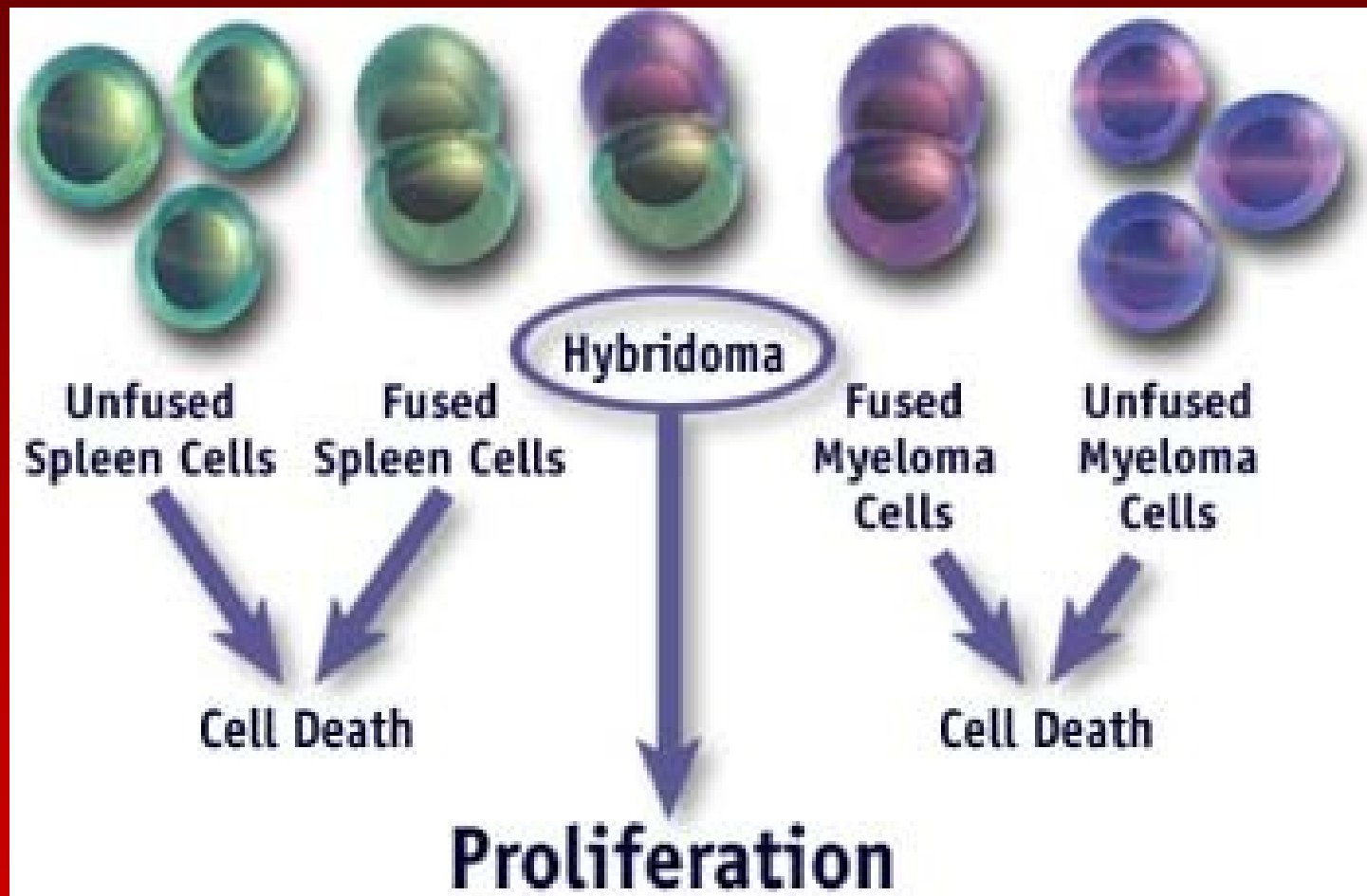
Spleen Cells (HGPRT+)

Myeloma Cells (HGPRT-)



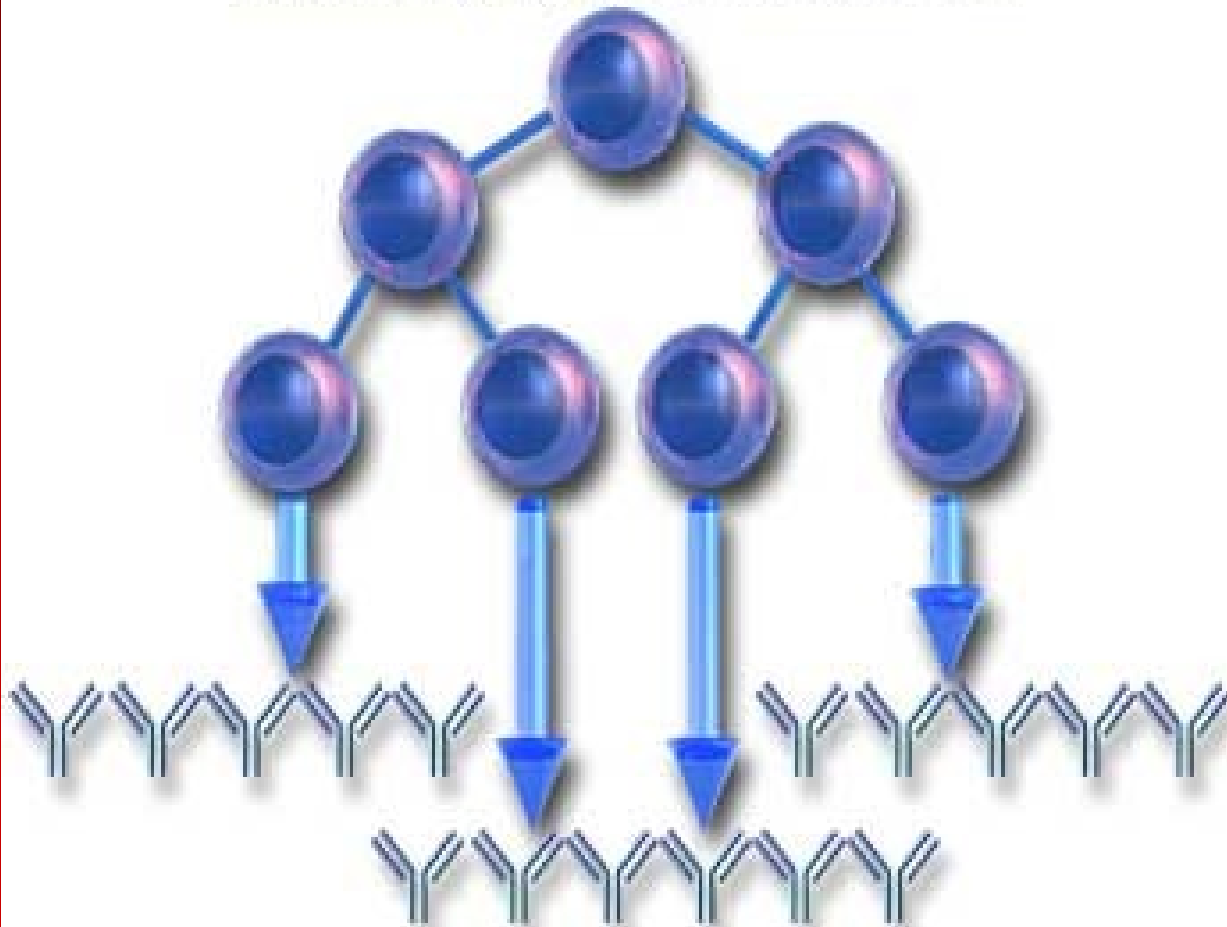
Fusion in Polyethylene Glycol

MAb III.

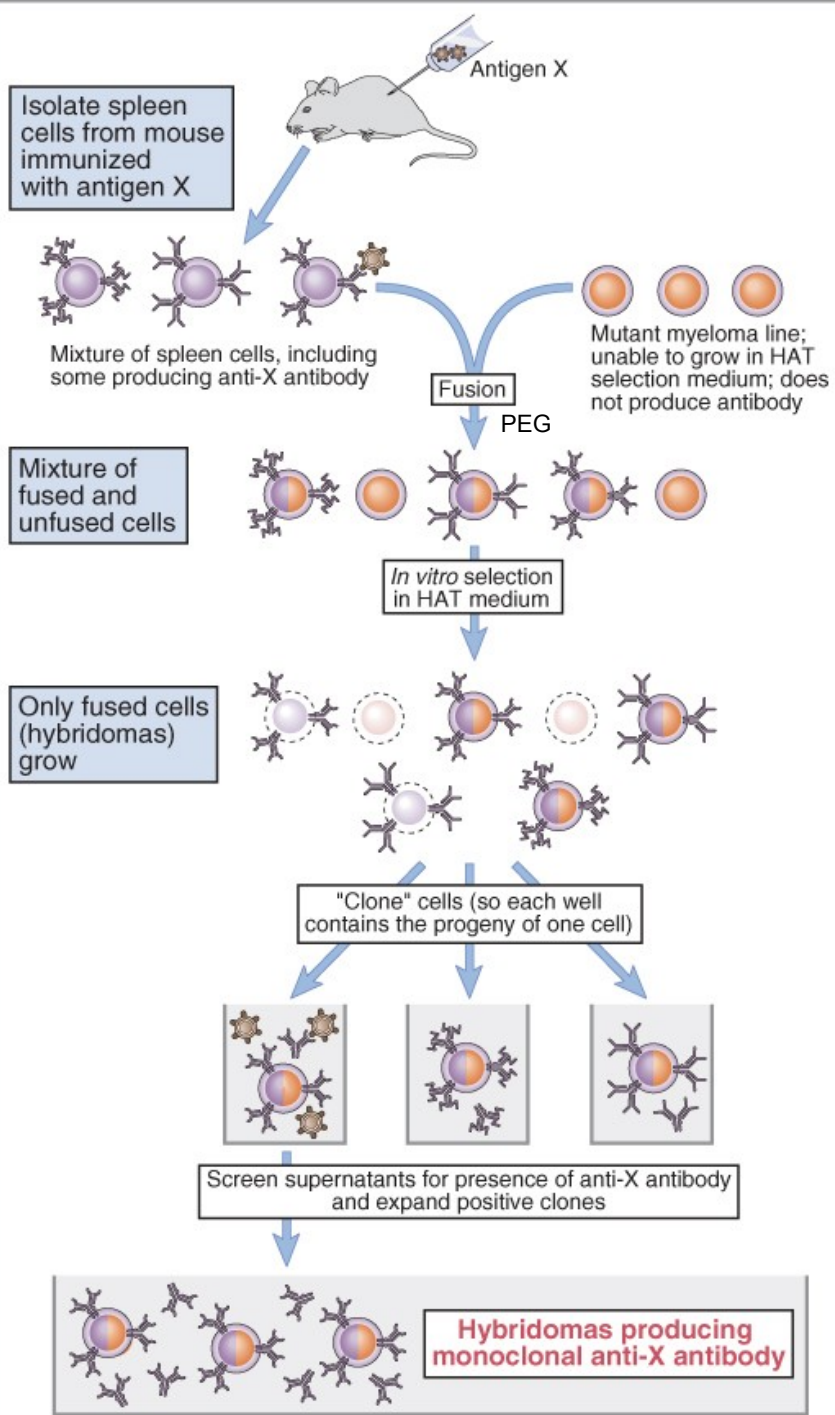


MAb IV.

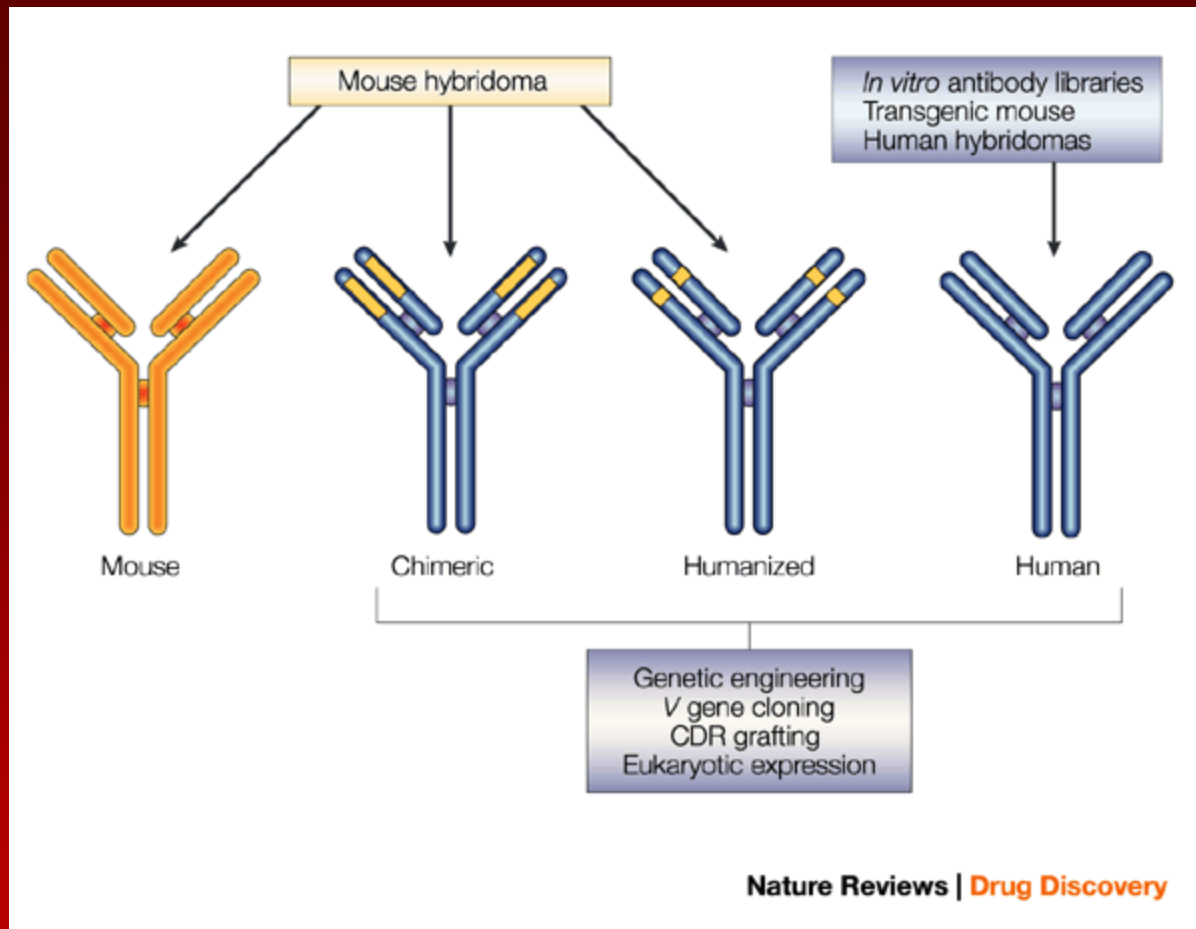
Clonal expansion of a single cell



Monoclonal antibodies with single antigen specificity



Mab POUŽÍVANÉ K TERAPII



- Myší (celé) **-momab**
- Chimérické (myší $V_H V_L$) **-ximab**
- Humanizované (myší hypervar.úseky) **-zumab**
- Lidské (připravené technikami mol.biol. dle knihoven)

Příklady klinického využití monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických chorob

- **Imunosuprese:**
 - - anti-CD3 (OKT3),
 - anti CD25 (basiliximab, daclizumab),
 - anti CD20 (rituximab)
- **Blokáda prozánětlivých cytokinů:**
 - Anti –TNF-a (infiximab, adalimumab) – revmatoidní artritida, Crohnova choroba,
- **Blokáda adhezivních molekul:**
 - anti integrin $\alpha 4\beta 1$ (natalizumab) – roztroušená mozkomíšní skleróza
 - Anti-CD11a (efalizumab) - psoriáza
- **Protialergická léčba**
 - anti-IgE (omalizumab): těžké formy astmatu

Monoklonální protilátky v humánní medicíně

- Transplantologie

Muronomab-CD3 , Basiliximab (IL2r alfa, chim.),
Daclizumab (IL2r alfa, hum.)

- Kardiologie

Abciximab (glykoprotein IIb a IIIa trombocytů, chim.)

- Revmatologie

Infliximab (TNFalfa, chim.) Adalimumab (TNFalfa, lidská)

- Gastroenterologie

Infliximab (TNFalfa, chim.)

- Infekční lékařství

Palivizumab (F-protein RSV, hum.)

- Neurologie

Natalizumab (inhibitor adhesivní molekuly a4 b1) - SM

Monoklonální protilátky v humánní medicíně

- **Onkologie**

Trastuzumab (HER2 onkoprotein, hum.), *ca mammae*

Cetuximab (epithelial growth factor receptor EGFR1,

chim.), Edrecolomab (epithelial cell adhesion molecule,

myší) *kolorektální ca*

- **Hematoonkologie**

Rituximab (CD20 na B-lymfocytech, chim.) *nehodgkinský lymfom, CLL*

Alemtuzumab (CD52 na B,T,NK,mono, hum.) *CLL*

- **Alergologie**

Omalizumab (humanisovaná anti IgE)

Produkce antigenů a protilátek v transgenních rostlinách

- **Rekombinantní protilátky**

SIgA/G Streptococcus mutans (tabák)

IgG HSV2glykoprotein B (sója)

scFv-bryodin 1 imunotoxin CD40

(tabák,bun.susp.)

- **Rekombinantní podjednotkové vakcíny**

HBsAg (tabák)

Glykoprotein viru vztekliny (rajče)

Termolabilní enterotoxin E.coli (tabák, brambory)

Virus prasečí gastroenteritidy (tabák, kukuřice)

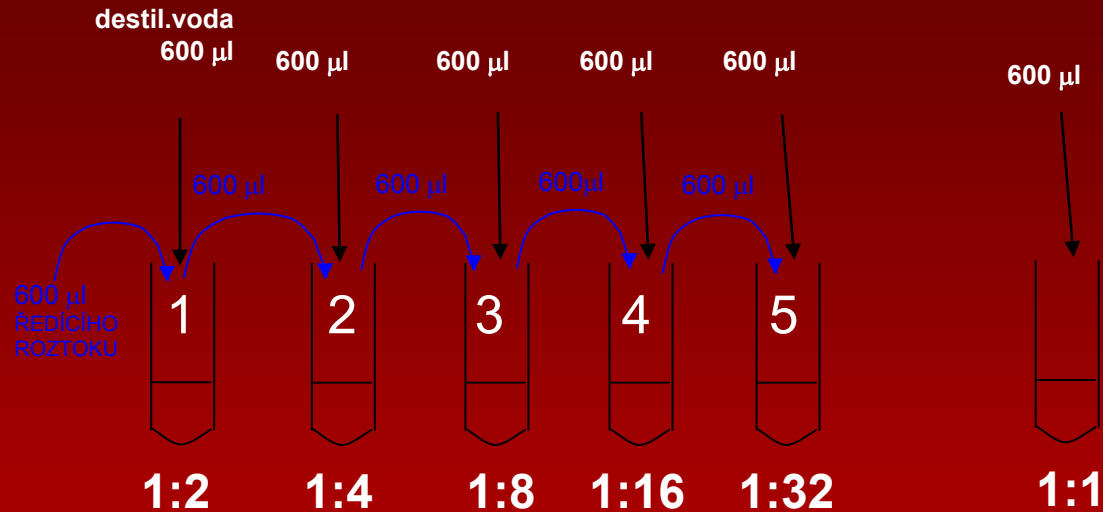
(Ma KCJ et al.: Nature Rev Genetics 2003; 4: 794-805)

CVIČENÍ Č.1

- Úkol č.1: ředění geometrickou řadou
(sloupce 1,2)
- Úkol č.2: pipetování do mikrotitrační destičky
(sloupce 3-11)

Geometrická řada

sl. 1	sl. 2
A ŘED.R.	A ŘED.R.
B ŘED.R.	B ŘED.R.
C 1:2	C 1:2
D 1:4	D 1:4
E 1:8	E 1:8
F 1:16	F 1:16
G 1:32	G 1:32
H H ₂ O	H H ₂ O



Do jamky vždy jen 100ul z naředěné geom. řady.

Zbytek destičky dopipetovat ředícím roztokem:

sl. 3-5 - dopipetovat 8-kanálovou pipetou

sl. 6-8 – dopipetovat opakovací pipetou (=stepper)

sl. 9-11 - dopipetovat 1-kanálovou pipetou

PROTOKOLY

v hlavičce:

jméno
datum
úloha č.
název úlohy

v protokolu samotném:

Princip
Postup
Výsledky
Závěr

...grafy...

PROTOKOL Č.1

- **Princip:** Okomentovat význam správného pipetování
- **Postup:** pomůcky, schémátka
- **Do výsledků:** min. hodnota, max. hodnota, průměr, směrodatnou odchylku jen u absorbancí nenáležících ke geometrické řadě (sl.3-11)