



# Protilátky a jejich výroba

Mgr. Julie Štíhová

# Protilátky

Chemické složení: glykoproteiny

Význam pro obratlovce:

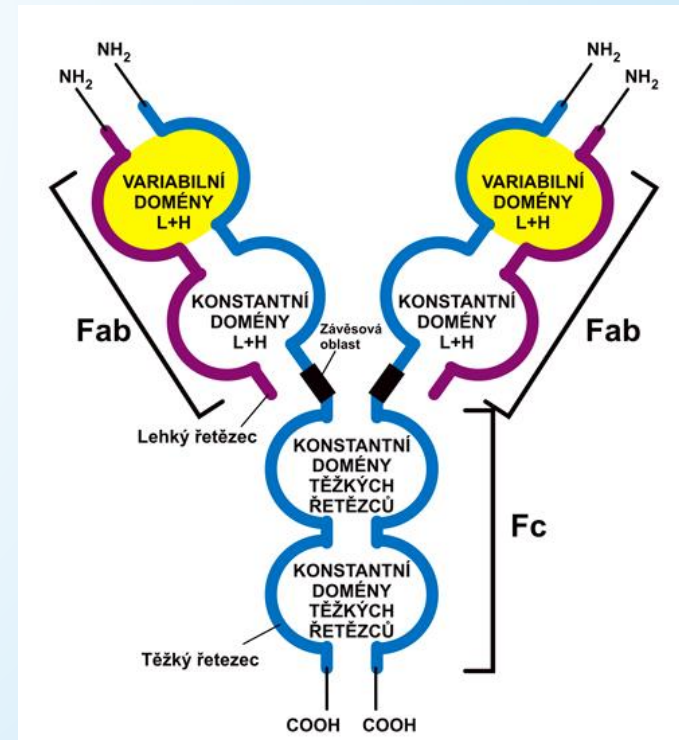
- ▶ Humorální složka adaptivní imunity
- ▶ Ochrana před extracelulárními patogeny

Význam pro medicínu:

- ▶ Reakce protilátky s antigenem je základem mnohých laboratorních testů
- ▶ Biologická léčba

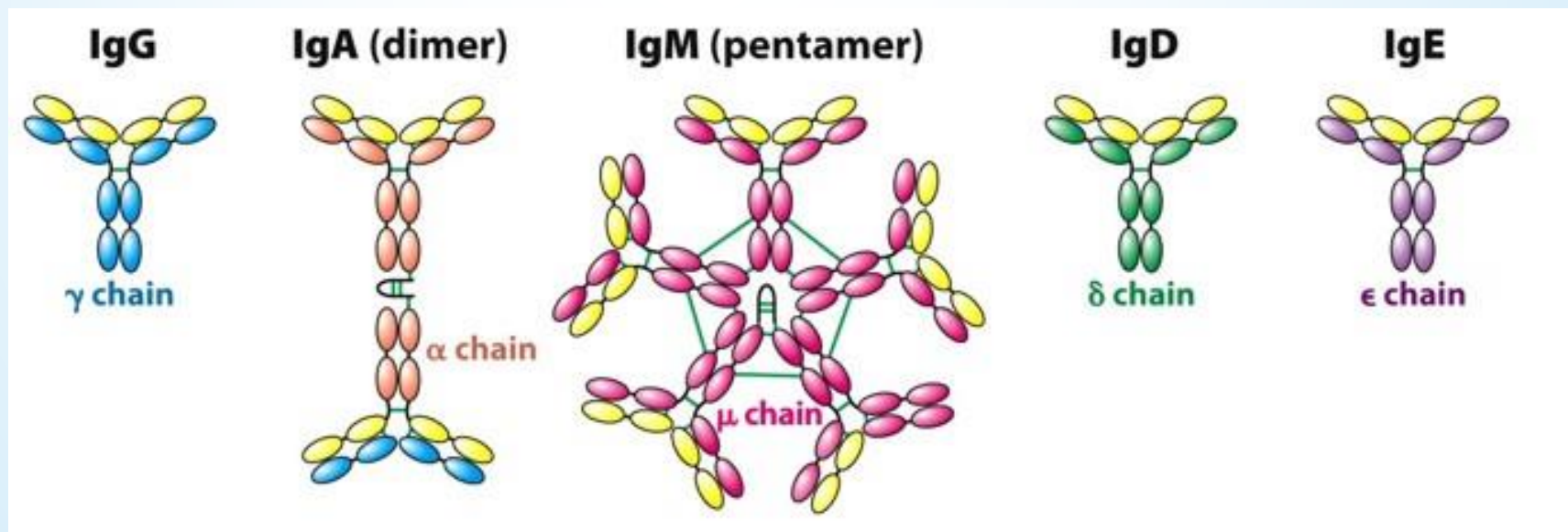
# Struktura protilátky

- 2 těžké (H) + 2 lehké řetězce (L)
- Spojení – kovalentní disulfidické můstky
- Pantová oblast - flexibilita
- L řetězec – 1 variabilní + 1 konstantní oblast
- H řetězec – 1 variabilní + 3-4 konstantní oblasti
- Fab fragment – variabilní oblasti – vazba antigenu
- Fc fragment – efektorová funkce



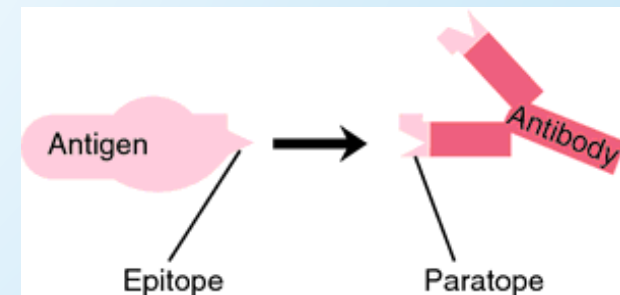
# Třídy protilátek

- ▶ 5 tříd – podle typu těžkého řetězce



# Principy reakce antigen-protilátka

- ▶ Antigen
  - ▶ Látka schopná vyvolat tvorbu protilátek
  - ▶ Konkrétní místo na jeho povrchu, kam se váže protilátka – **EPITOP**
- ▶ Protilátka
  - ▶ Specifický produkt terminálních vývojových stádií B lymfocytů
  - ▶ Místo, které reaguje s epitopem antigenu – **PARATOP**
- ▶ Vazba Ag-Ab je reverzibilní – slabé nevázebné interakce



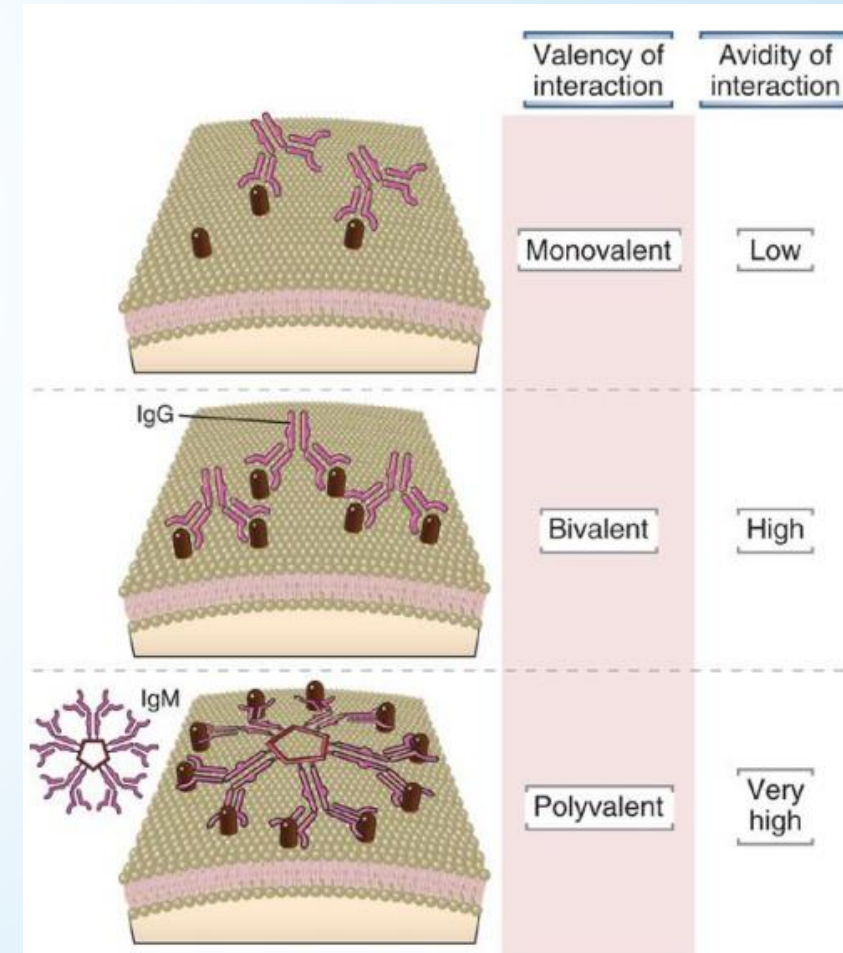
# Afinita vs avidita protilátek

## ➤ Afinita

- síla interakce mezi 1 epitopem Ag a 1 paratopem Ab

## ➤ Avidita

- je dána vícenásobnou interakcí mezi multivalentním antigenem a protilátkou
- IgG – 2 vazebná místa
- Sekreční IgA – 4 vazebná místa
- Pentamer IgM – až 10 míst (reálně kolem 6)





# Protilátky mohou být

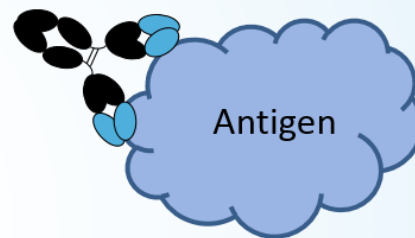
## ➤ Monoklonální

- Produkty jediného klonu B lymfocytů
- namířeny proti 1 epitopu jediného antigenu
- Velmi vysoká specifita

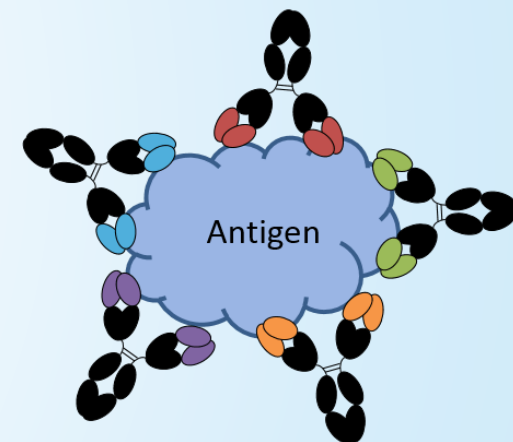
## ➤ Polyklonální

- Namířeny proti více epitopům jednoho či více antigenů
- Pokud byl při imunizaci použit 1 antigen – vzniká monospecifické antisérum
- Pokud bylo při imunizaci použito antigenů více – polyspecifické antisérum

### Monoclonal antibody



### Polyclonal antibody





# Výroba polyklonálních protilátek



# Výroba polyklonálních protilátek

## 1. Výběr vhodného antigenu

- ▶ Nutná vysoká čistota – přečištění pomocí chromatografie, ELFO

## 2. Zvýšení afinity antigenu k buňkám imunitního systému

- ▶ Problém – solubilní antigeny špatně aktivují imunitní systém
- ▶ ADJUVANCIA – zvyšují imunogenost a udržují antigen déle v těle
  - ▶ soli  $\text{Al}_2\text{O}_3$
  - ▶ Freudovo adjuvans (kompletní/inkompletní) – adsorpce antigenu na kapičky minerálního oleje (s/bez přídavku usmrcených mykobakterií)

# Výroba polyklonálních protilátek

## 3. Výběr vhodného zvířete

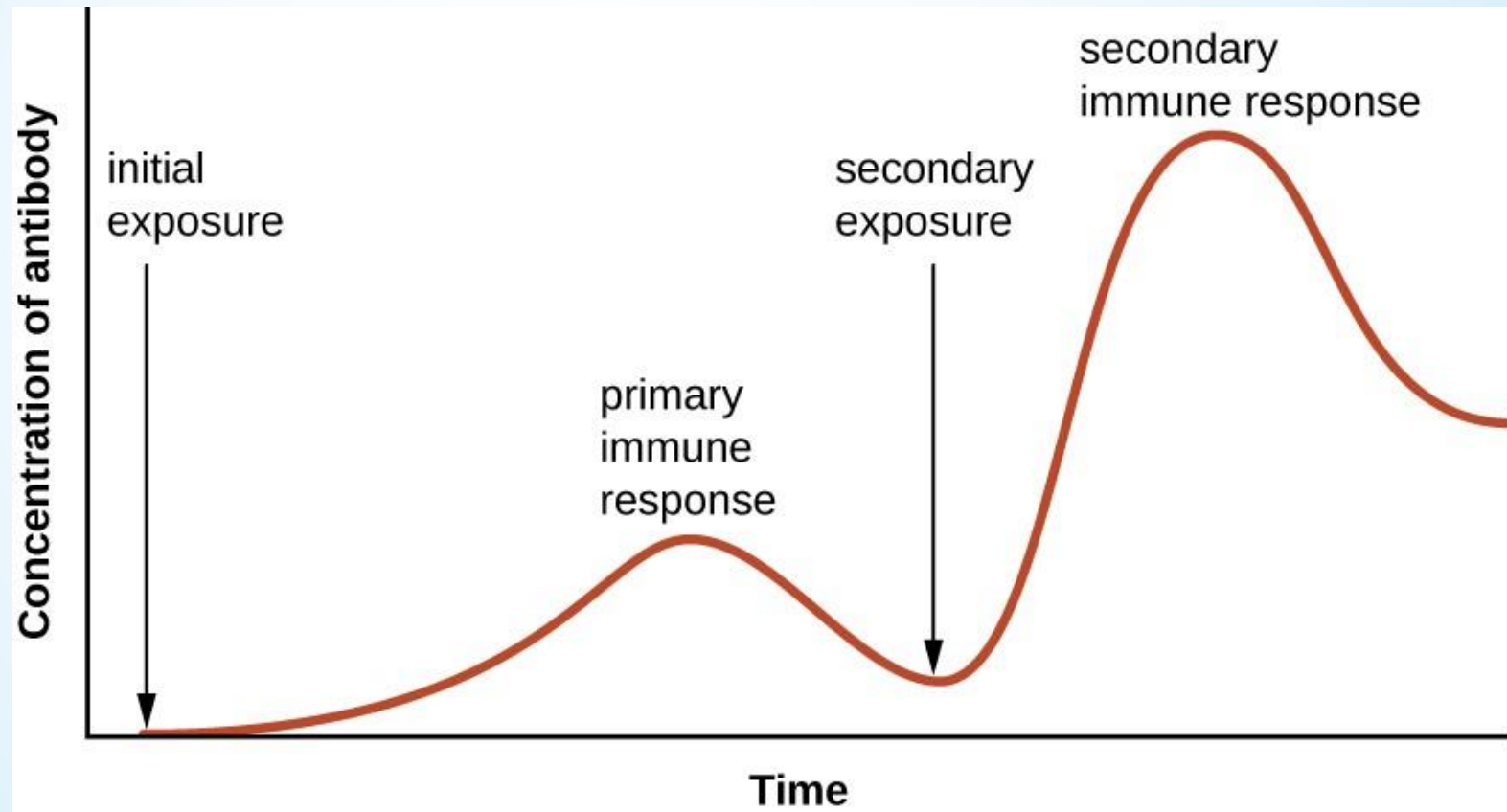
- Fylogeneticky co nejvzdálenější druh vzhledem k povaze antigenu



## 4. Způsob aplikace – nejčastěji intradermálně, subkutánně

- Antigen je vycytán ve spádových lymfatických uzlinách – maximální odpověď

# Výroba polyklonálních protilátek



# Výroba polyklonálních protilátek

## 5. Sběr krve

- ▶ Opakované odběry nižšího množství krve
- ▶ Kompletní vykrvení zvířete - usmrcení

## 6. Získání séra s obsahem protilátek

## 7. Přechištění protilátek a jejich kvantifikace

- ▶ Nespecifické metody – izolace protilátek určité třídy
  - ▶ Precipitace síranem amonným, elektroforéza, ionexová nebo gelová chromatografie
- ▶ Specifické metody – izolace protilátek vůči konkrétnímu antigenu
  - ▶ Afinitní chromatografie, imunoadsorpce

# Polyklonální protilátky - využití

## Nefelometrie

- Reakce Ag-Ab → precipitace

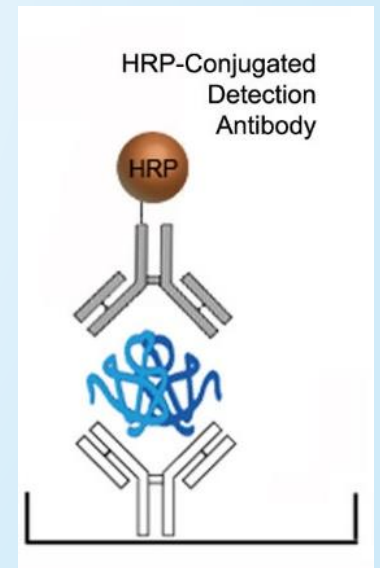
## Léčba

- Antiséra proti hadím jedům



## ELISA

- Záchytné/detekční protilátky
- Vyšší senzitivita než monoklonální Ab
- Nižší specifita



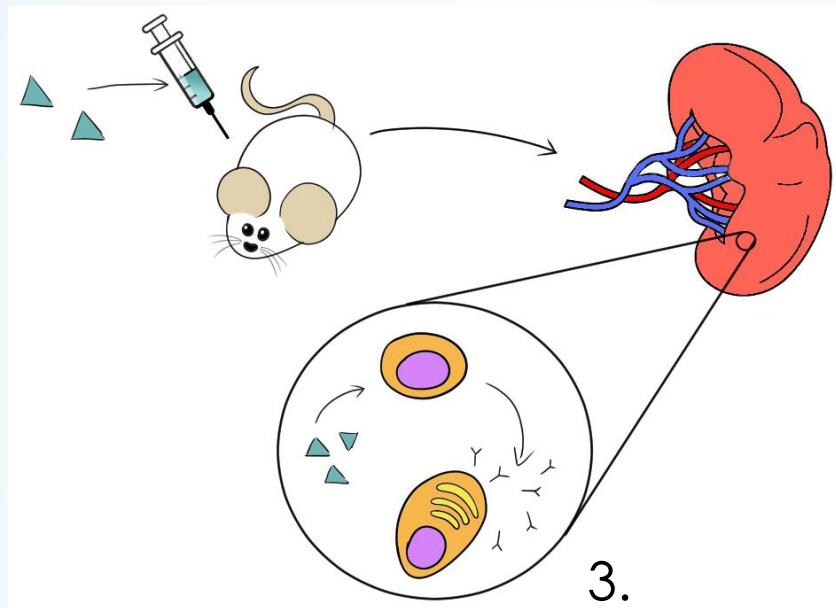


# Výroba monoklonálních protilátek



# Výroba monoklonálních protilátek

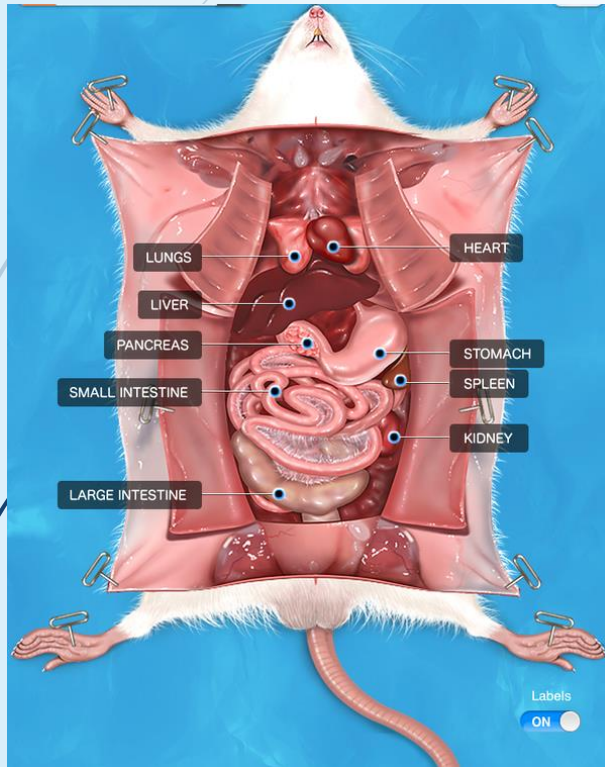
1.  
Aplikace antigenu  
intravenózně



2.  
Antigeny jsou krví zaneseny  
do sleziny – zde je imunitní  
odpověď na antigen  
maximální

3.  
Ve slezině diferencují antigen specifické  
B lymfocyty do plazmatických buněk,  
které produkují protilátky

# Výroba monoklonálních protilátek



4. Po několika týdnech je z imunizované myši vyjmuta slezina

5. Izolace plazmatických buněk ze sleziny



# Výroba monoklonálních protilátek

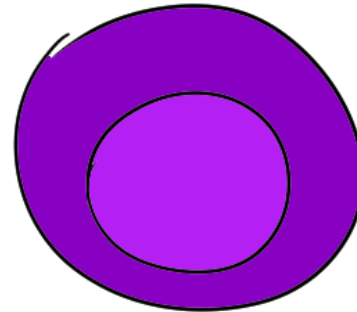
- 1975 – Kohler a Milstein – fúze s myšími myelomovými buňkami

Slezinná plazmatická buňka



- Produkuje Ag specifické protilátky
- Velmi krátká životnost

Myelomová buňka

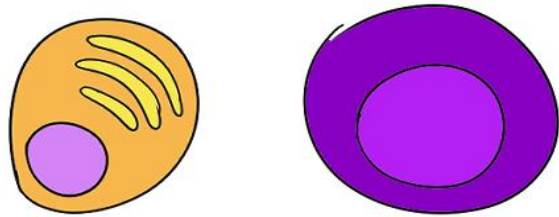


- Neprodukuje protilátky
- Je nesmrtelná

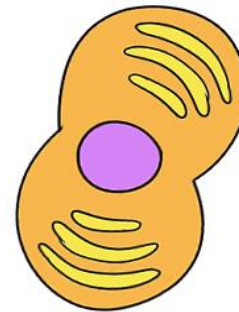
6. Fúze buněk polyethylenglykolem (PEG)

# Výroba monoklonálních protilátek

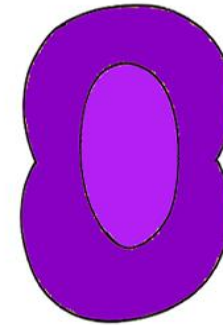
Nezfúzované B lymfocyty a  
myelomové buňky



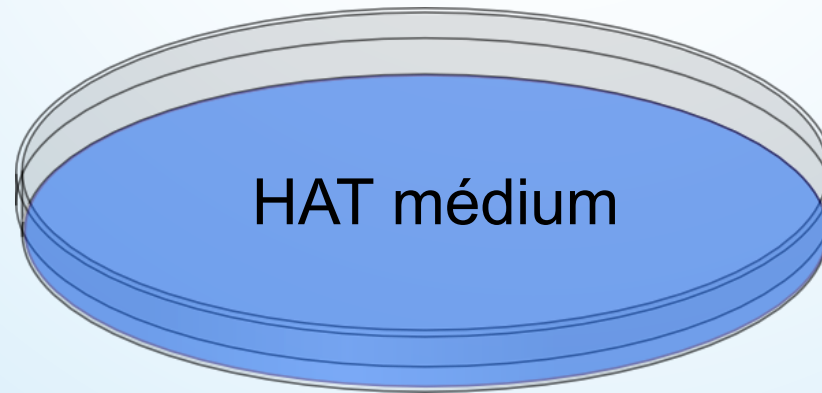
Zfúzované  
B lymfocyty



Zfúzované myelomové  
buňky

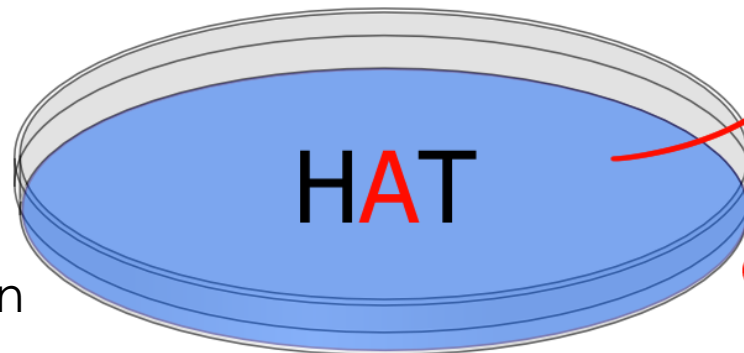
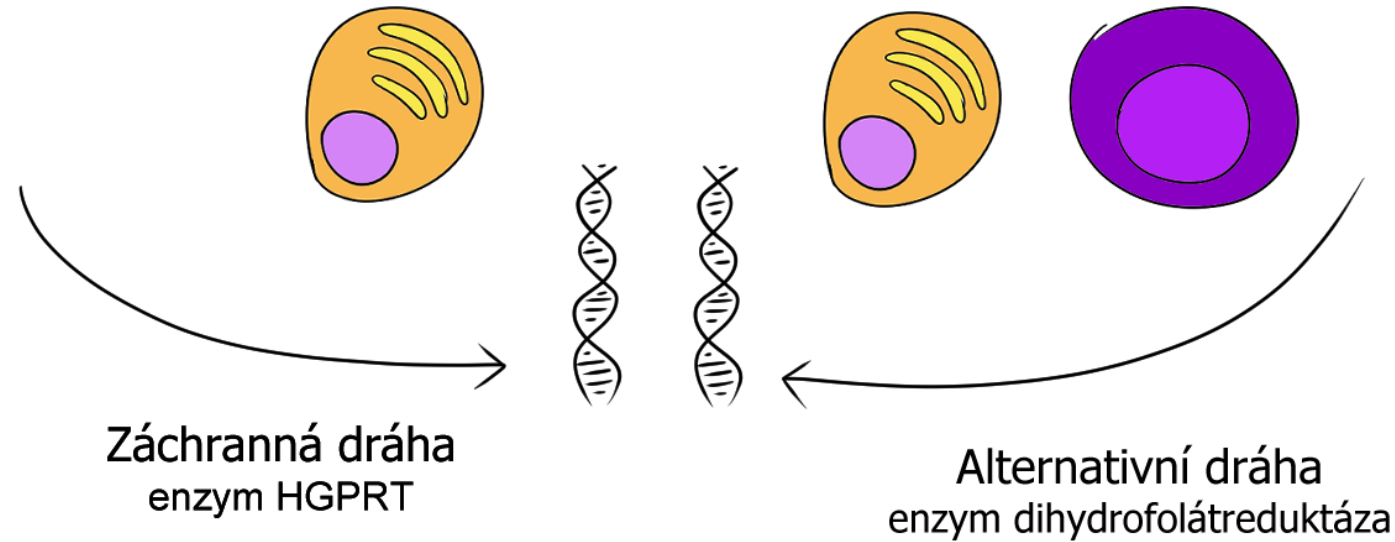


HYBRIDOM



7. Buněčná směs je kultivována v  
selekčním HAT médiu  
(Hypoxantin, Adenosin, Thymidin)

# Selekce – enzymatický blok

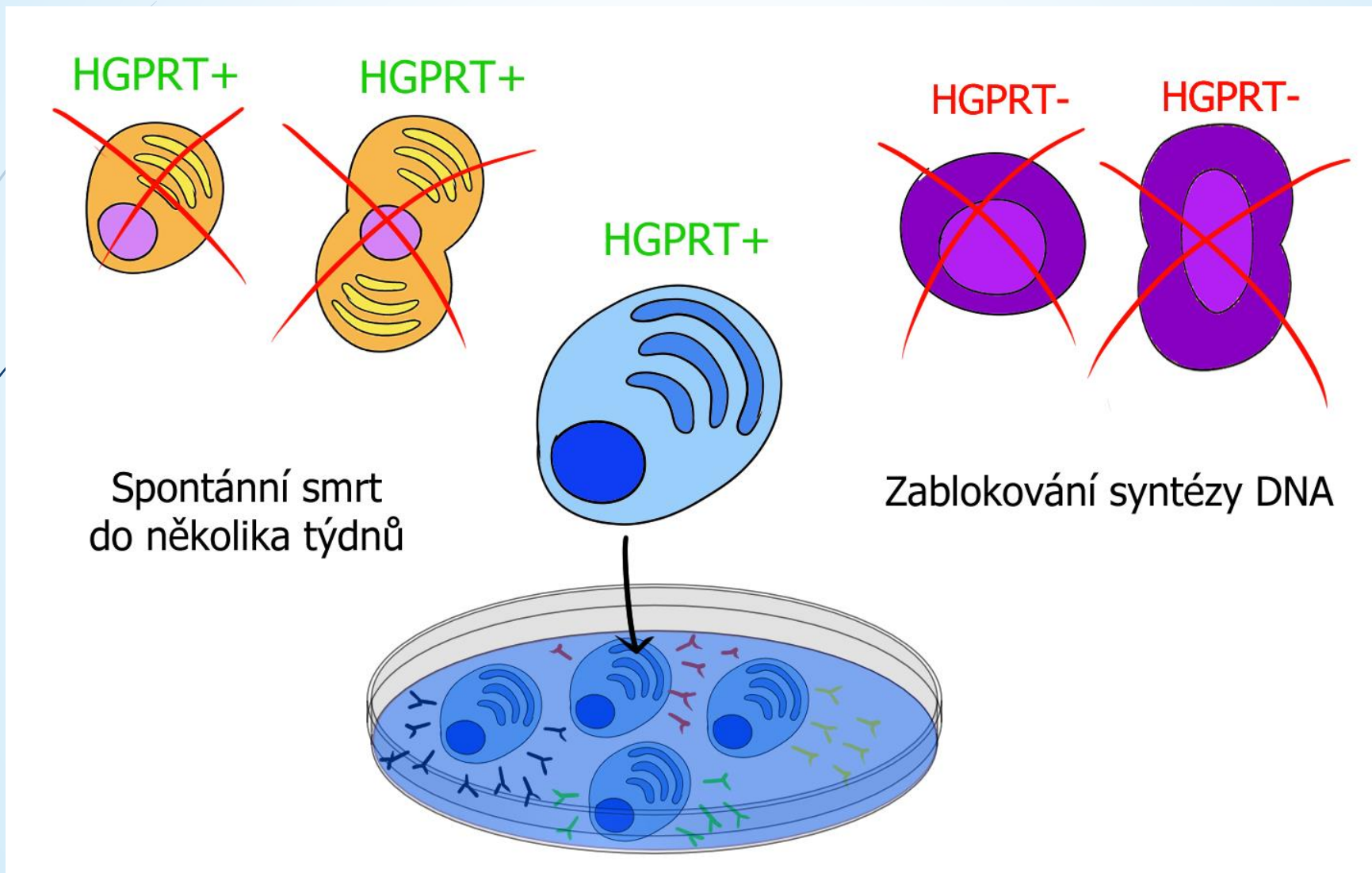


**Aminopterin  
blokuje  
dihydrofolátreduktázu**

HGPRT = **H**ypoxantin **G**uanin  
**P**hospho**R**ibosyl **T**ransferáza



# Selekce – enzymatický blok



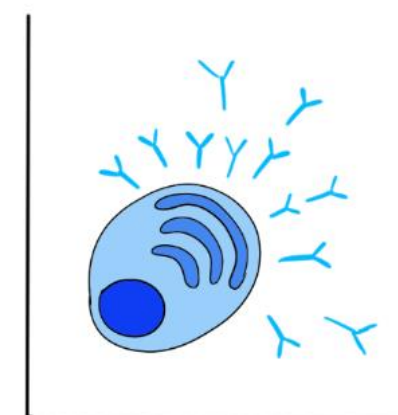
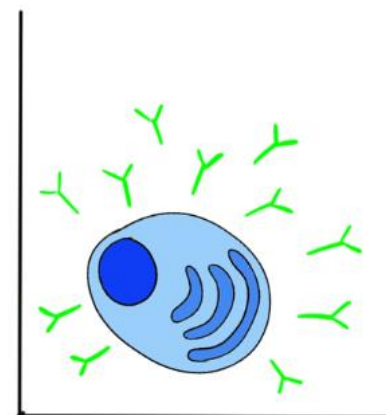
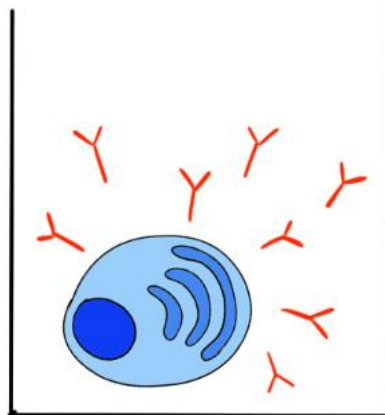
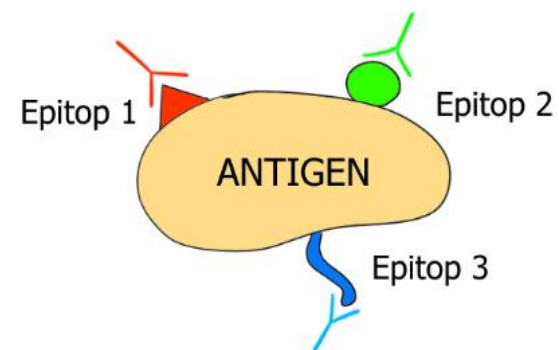


# Výroba monoklonálních protilátek

8. Hybridomy jsou rozděleny do jednotlivých jamek

9. Dále se udržují pouze ty buňky, které produkují Ab proti požadovanému epitopu

10. Přečištění, kvantifikace, validace



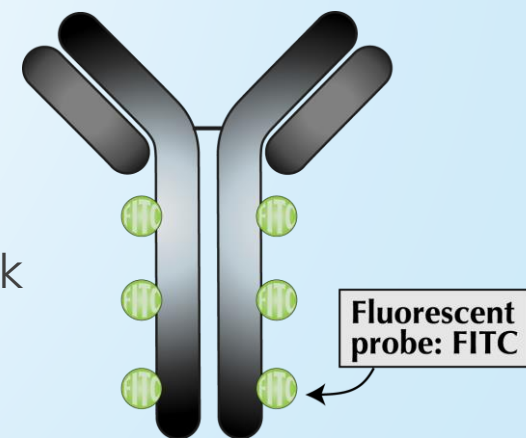
# Využití monoklonálních protilátek

- ▶ Konjugace monoklonálních protilátek s fluorochromy
  - ▶ (FITC, PE, APC, PC7, Alexa fluor, KO a další...)
- ▶ Základní reagensie pro imunofenotypizaci

## IMUNOFENOTYPIZACE

„stanovení fenotypu buněk na základě imunologické detekce jejich povrchových znaků (markerů) pomocí průtokové cytometrie“

- ▶ CD nomenklatura → CD znaky na buňkách
- ▶ Některé jsou pro určité typy buněk vysoce specifické
- ▶ Detekce CD znaků pomocí fluorescenčně značených protilátek





# Využití monoklonálních protilátek

Příklady využití konjugátů protilátka-fluorochrom jako diagnostik v laboratoři:

- ▶ Rozlišení T a B lymfocytárních subpopulací
- ▶ Rozlišení klidových a aktivovaných forem leukocytů
- ▶ Rozlišení časně/pozdní aktivace buněk
- ▶ Rozlišení vývojových stádií buněk
- ▶ Proliferace
- ▶ Apoptóza
- ▶ Imunofenotypizace hematologických malignit

# Využití monoklonálních protilátek

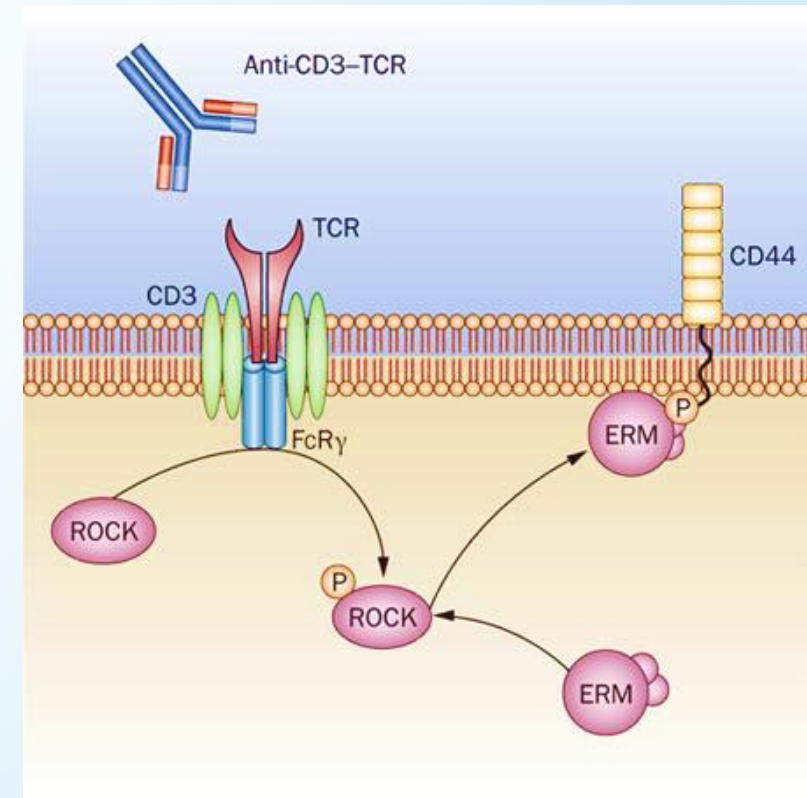
Monoklonální protilátky neznačené fluorochromy jako stimulancia buněk:

Příklad:

▶ Anti-CD3+CD28 – aktivace T lymfocytů

▶ Produkce cytokinů – INF- $\gamma$ , IL-2

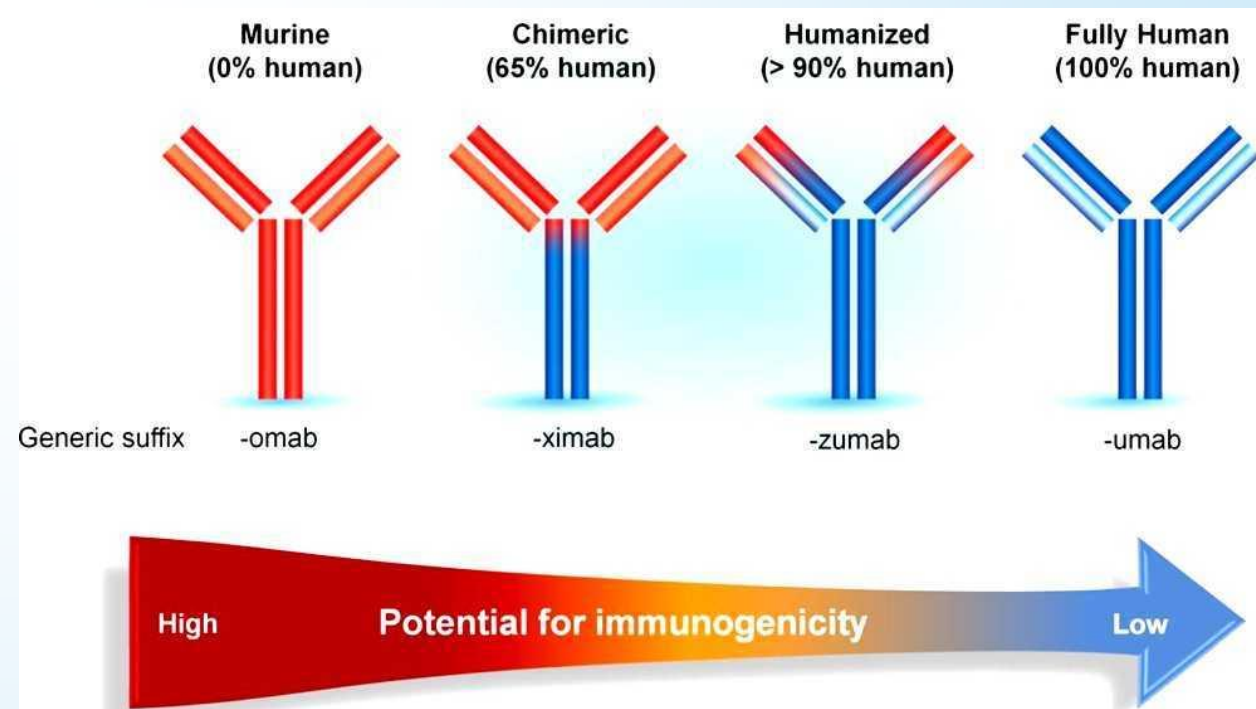
▶ Proliferace



# Využití monoklonálních protilátek

- Monoklonální protilátky jako léčiva: BIOLOGICKÁ LÉČBA
- Různé druhy protilátek:

- Myší (omab)
- Chimérické (ximab)
- Humanizované (zumab)
- Lidské (umab)



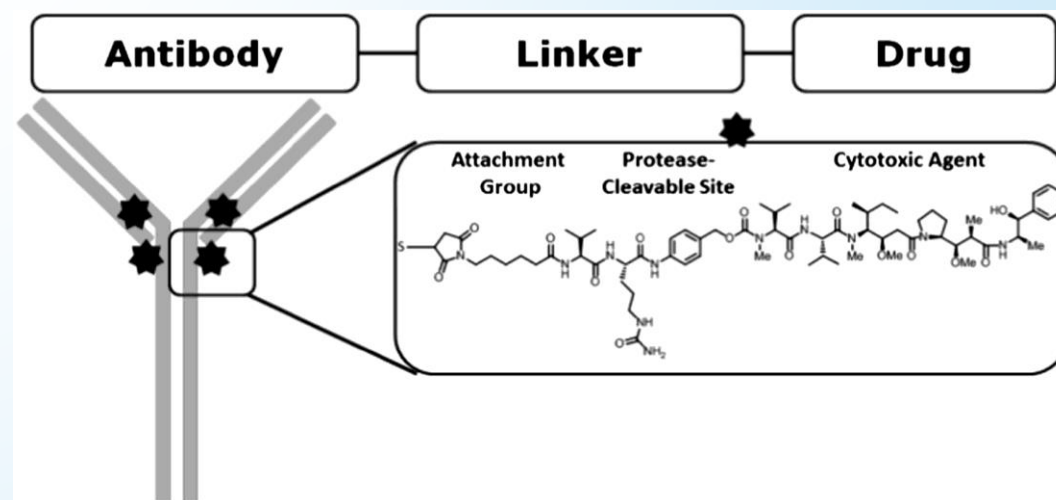
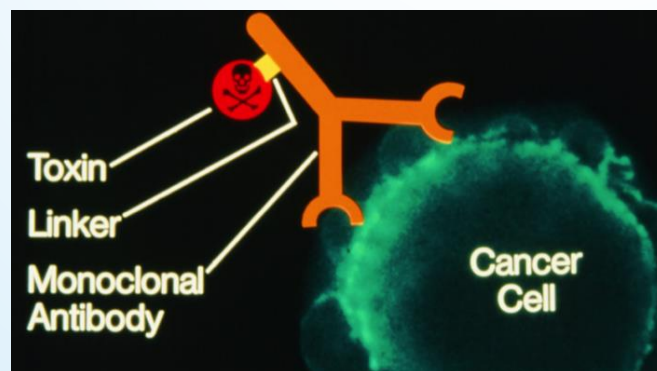
# Využití monoklonálních protilátek

- ▶ Imunosuprese
  - ▶ Anti CD20 (Rituximab): B lymfocytární malignity
- ▶ Blokáda prozánětlivých cytokinů
  - ▶ Anti TNF- $\alpha$  (Infliximab): léčba Crohnovy choroby, revmatoidní artritidy
- ▶ Blokáda adhezivních molekul
  - ▶ Anti CD11a (Efalizumab): léčba lupénky
- ▶ Protialergická léčba
  - ▶ Anti-IgE (Omalizumab): léčba těžkých forem astmatu



# Využití monoklonálních protilátek

- ▶ Nová generace monoklonálních protilátek určených k biologické léčbě: konjugace s cytostatiky
- ▶ Zesílení cytotoxického účinku na maligní buňky



# Shrnutí

<b>Polyklonální protilátky</b>	<b>Monoklonální protilátky</b>
Snadnější výroba	Náročná výroba
Relativně levné	Drahé
Vyšší senzitivita	Nižší senzitivita
Nižší specifita	Vysoká specifita
Vyšší pravděpodobnost zkřížené reaktivity	Nízká pravděpodobnost zkřížené reaktivity