



Monoklonální protilátky

Jak je připravit a používat

B. Vojtěšek

Masarykův onkologický ústav Brno

Prof. D.P. Lane a prof. E.B. Lane

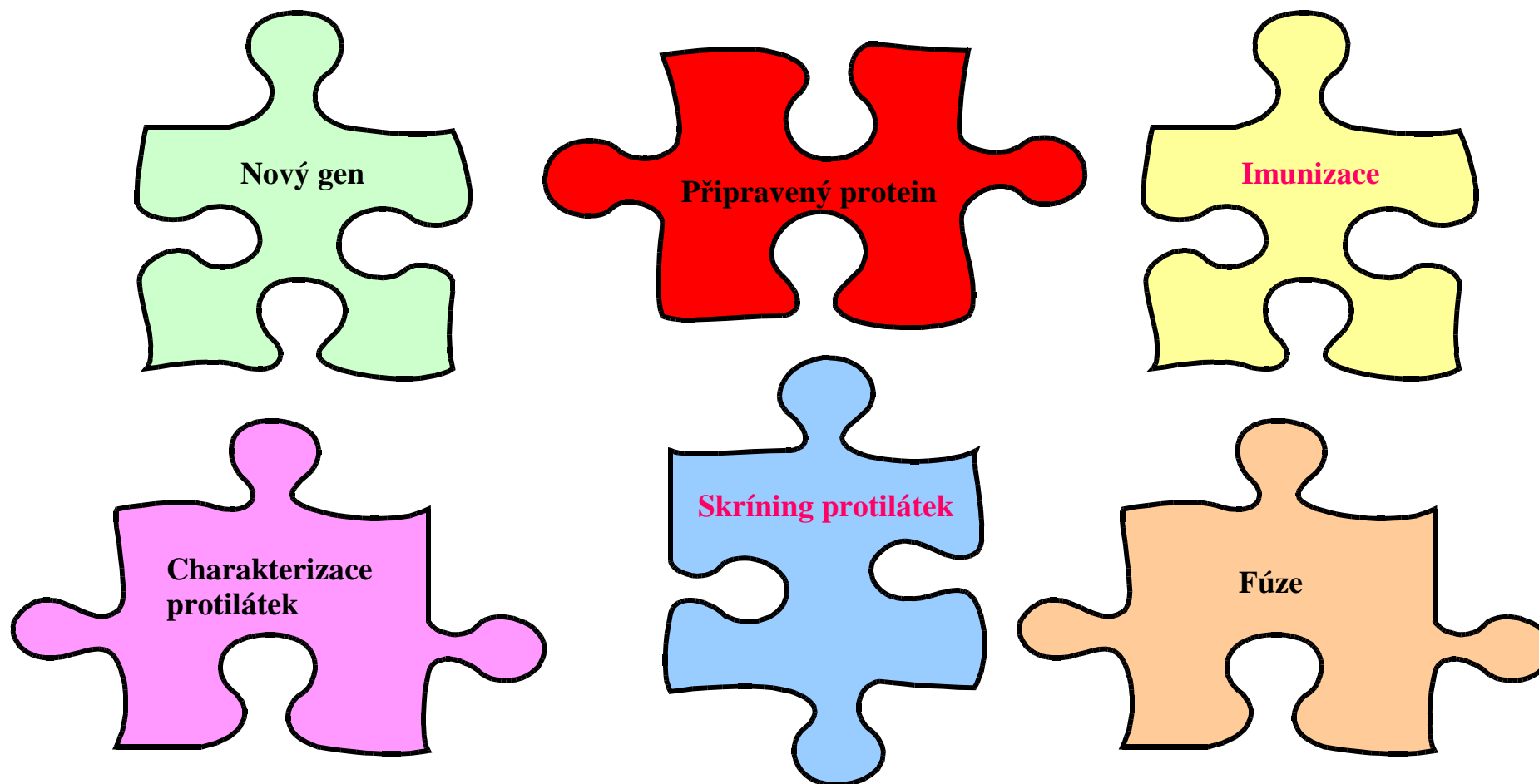
Institute of Medical Biology in Singapore



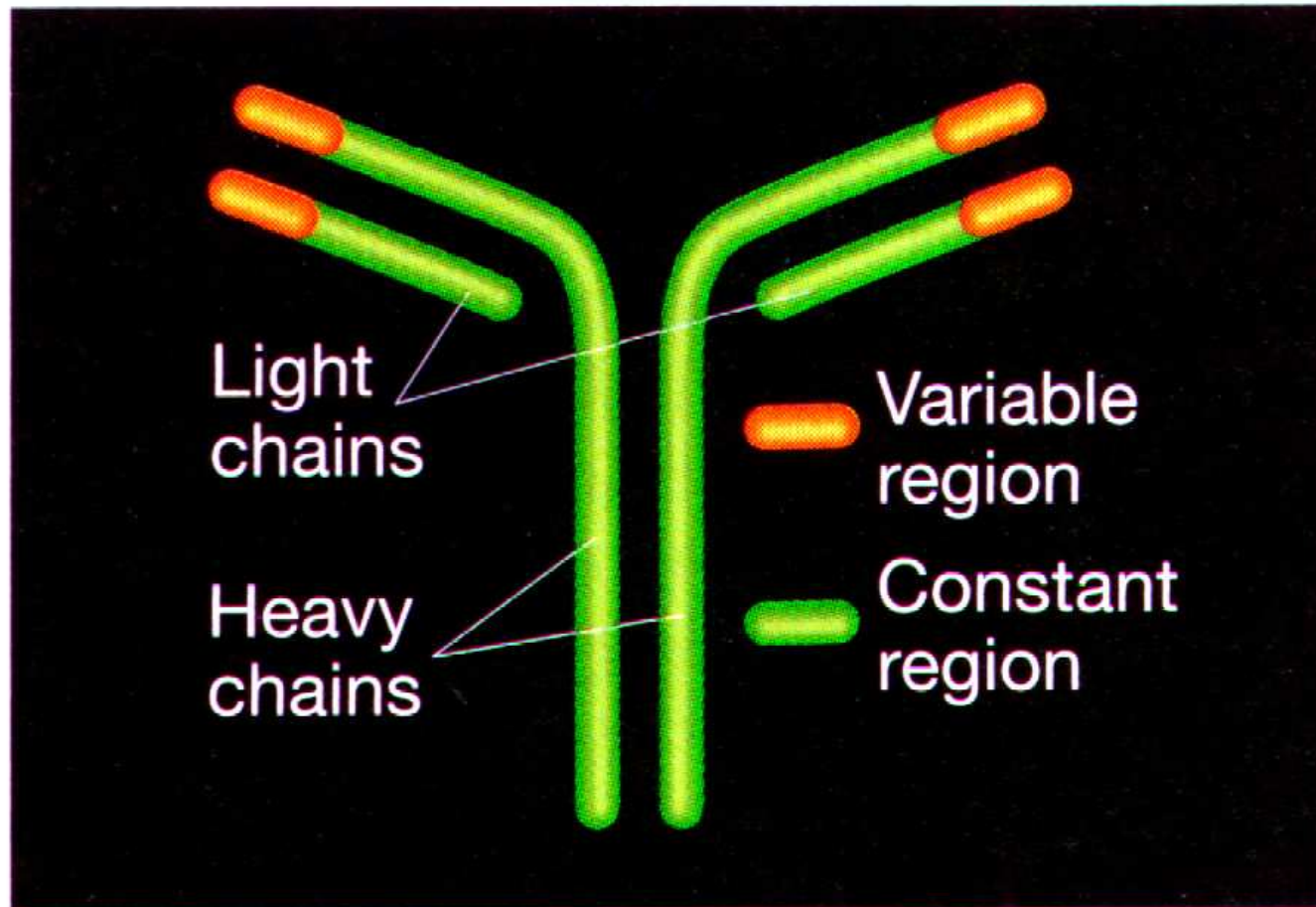
Vývoj protilátek/ Imunizace/ Strategie skríníngu

Nejlepší informace pro vývoj protilátek včetně výběru antigenů, imunizačních schémat, strategie skríníngu a metod charakterizace jsou v laboratorním manuálu **“ANTIBODIES”** a v novějším vydání tohoto manuálu **“Using Antibodies”** od prof. Davida Lane a prof. Eda Harlow.

“Monoclonal antibodies” od prof. P. Shepherd a prof. C. Dean.

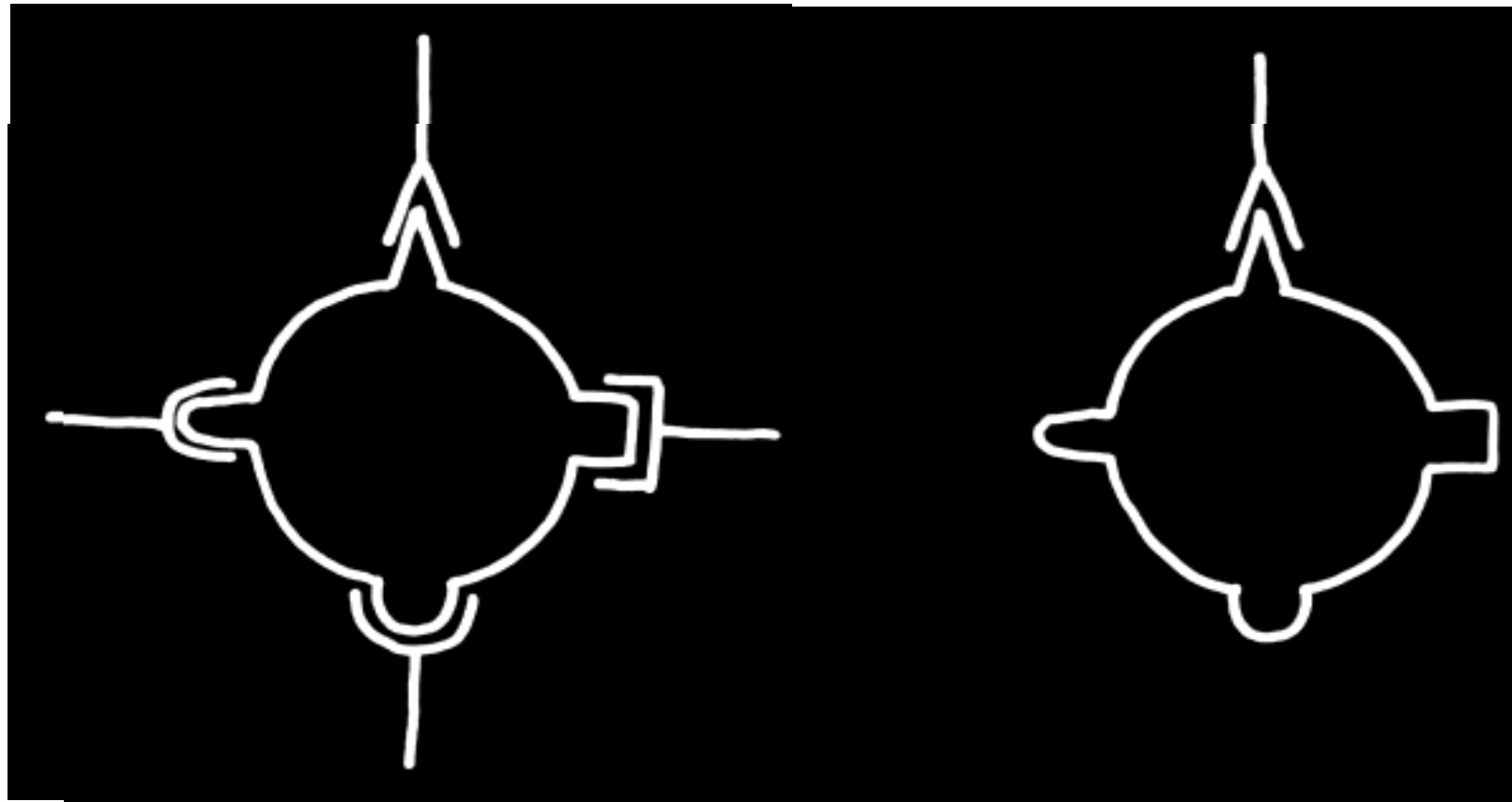


Protilátky

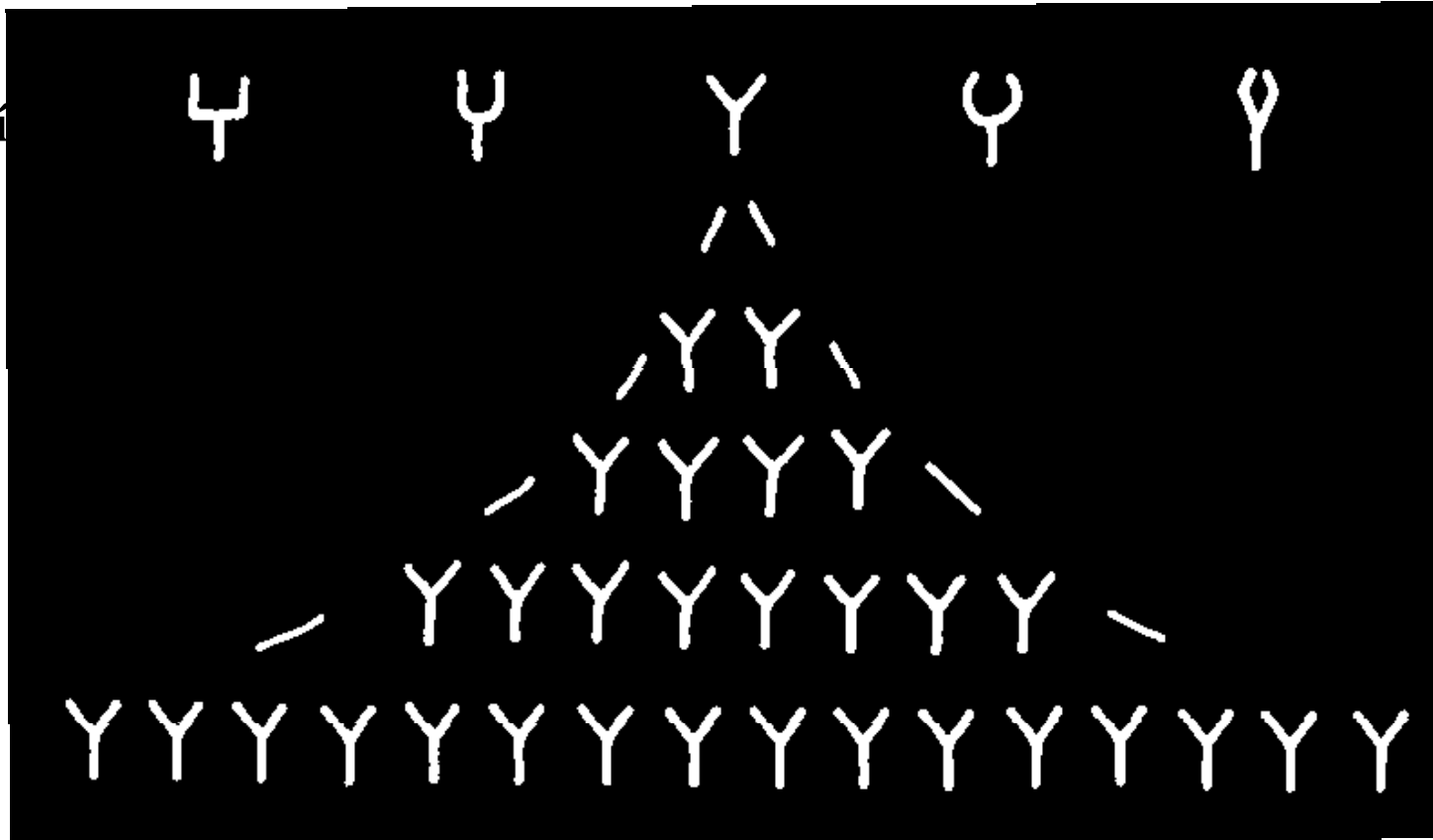


- Variabilita: gen imunoglobulinu má celou řadu sestřihových variant a tím vznikají unikátní protilátky
- Jsou produkovány B-lymfocyty

Polyklonální versus monoklonální protilátky



polyklonální



monoklonální

Monoklonální protilátky

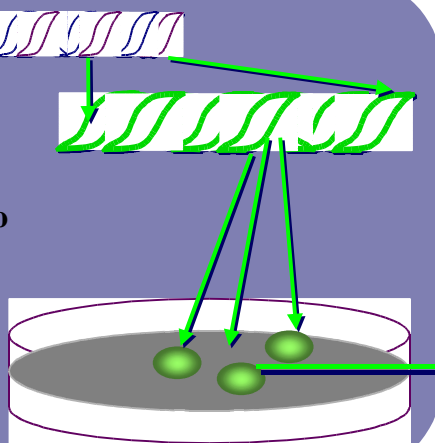
- Imortalizace individuálních B buněk
- Selekcce „single“ buněčných klonů
- Namnožení ve formě buněčných kultur

Georges Köhler & Cesar Milstein, 1975

- Sekrece monoklonálních protilátek je
 - **Homogenní**
 - **Stabilní**
 - **Redukuje množství použitých zvířat**
 - **Nelimitovaný zdroj protilátek**

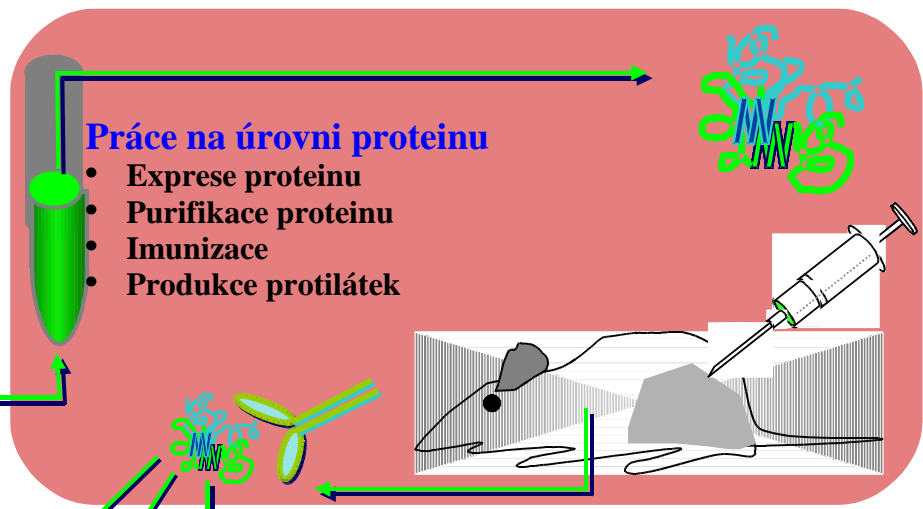
Práce na úrovni DNA

- Klonování genu
- Výběr a příprava vhodného expresního systému



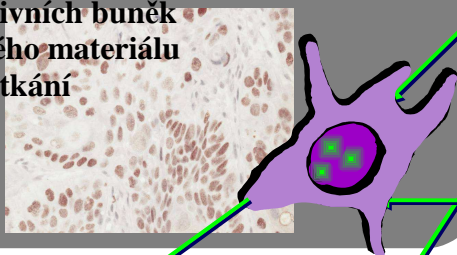
Práce na úrovni proteinu

- Exprese proteinu
- Purifikace proteinu
- Imunizace
- Produkce protilátek



Imunocytochemická a imunohistochemická charakterizace protilátek

- Barvení pozitivních a negativních buněk
- Barvení archivního tkáňového materiálu
- Testování podmínek fixace tkání
- "Oživení" antigenů



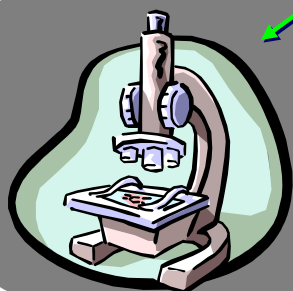
Imunochemická charakterizace protilátek

- Pomocí purifikovaných proteinů a lyzátů
- Dot-blot, ELISA
- 1D and 2D elektroforéza a Western blotting

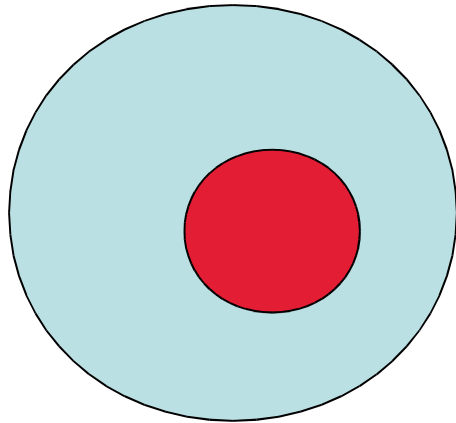


Aplikace

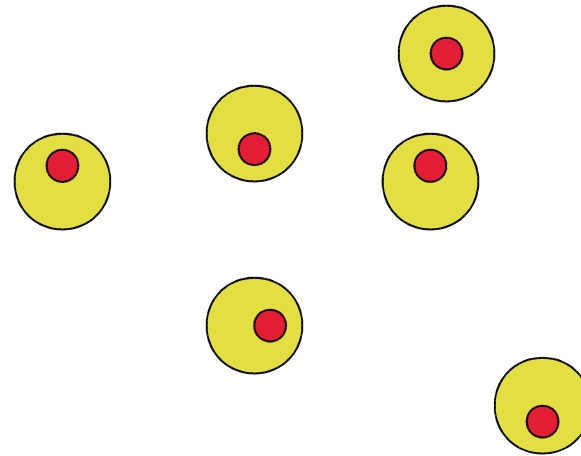
- Imunohistochemie na archivním materiálu
- imunocytochemie
- ELISA
- imunoprecipitace
- Western blotting a další metody



Příprava monoklonálních protilátek

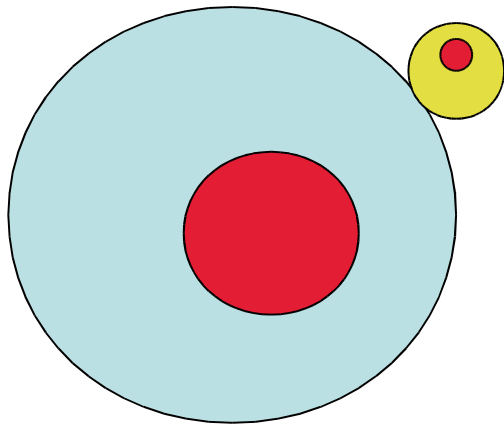


Myší myelomová buněčná linie
("B cell tumour")

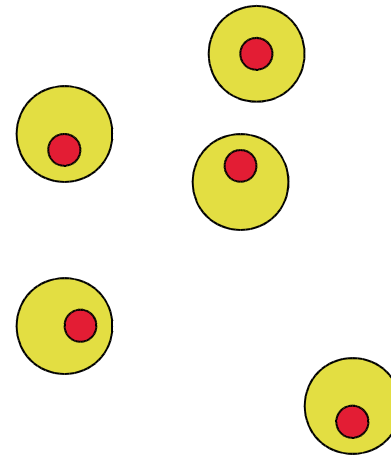


Normální B buňky ze sleziny
imunizované myši

Příprava monoklonálních protilátek

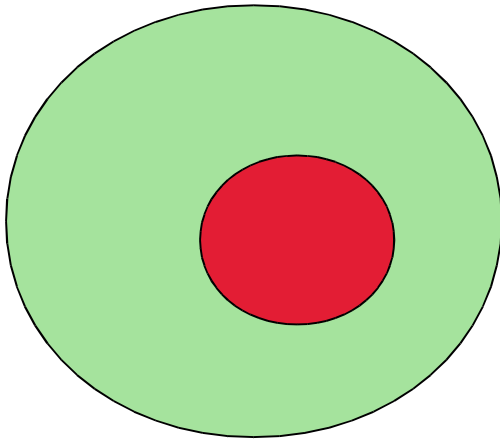


Myší myelomová buněčná linie
("B cell tumour")



Normální B buňky ze sleziny
imunizované myši

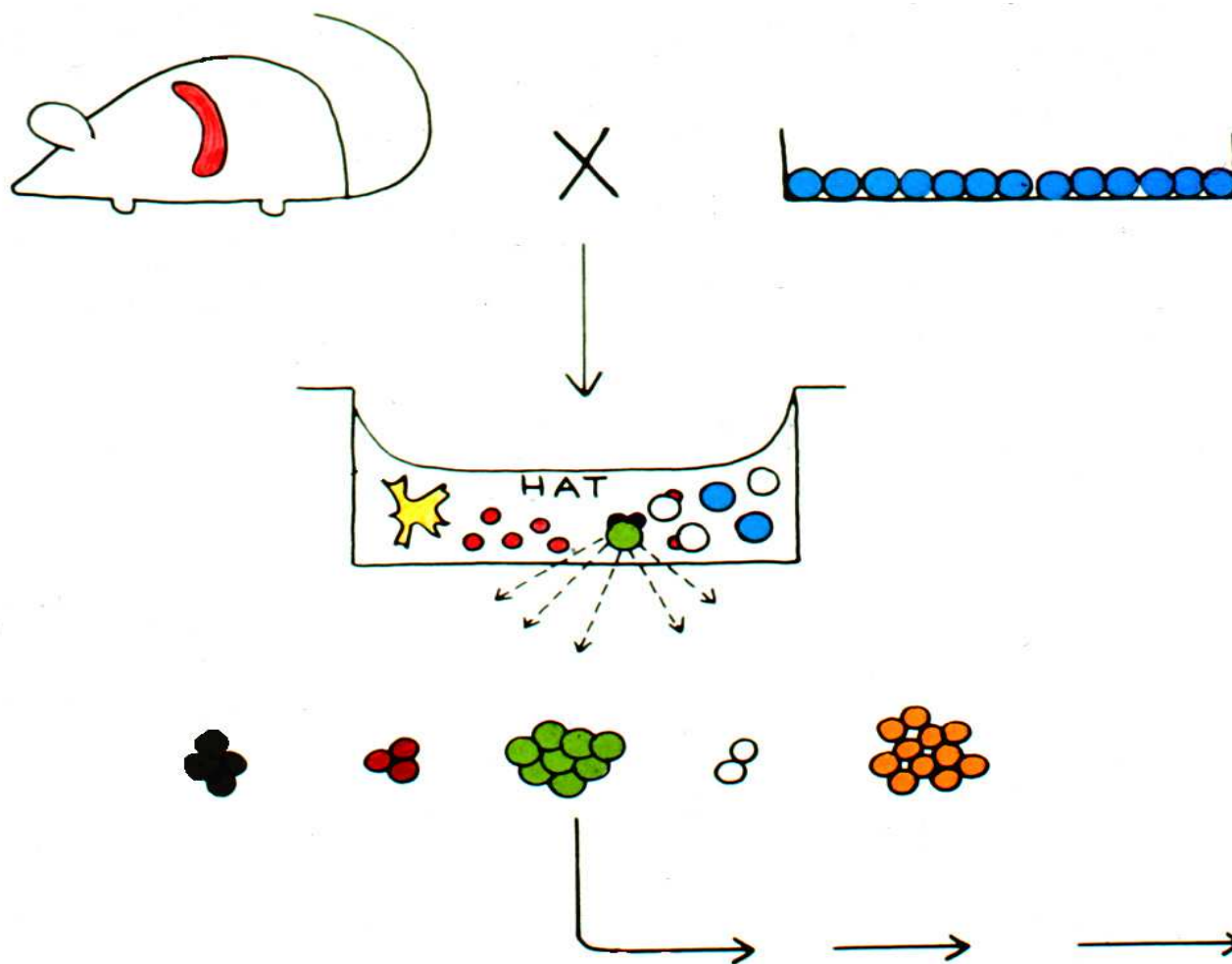
Příprava monoklonálních protilátek

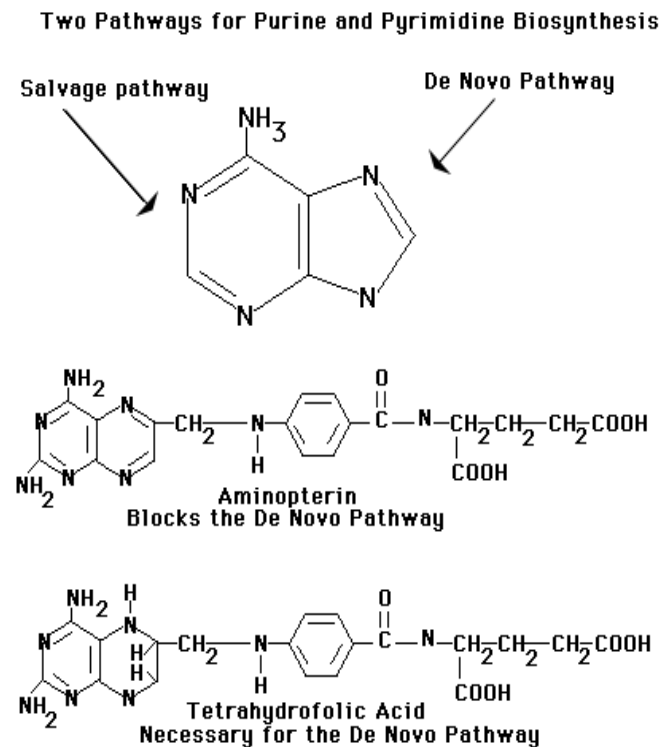
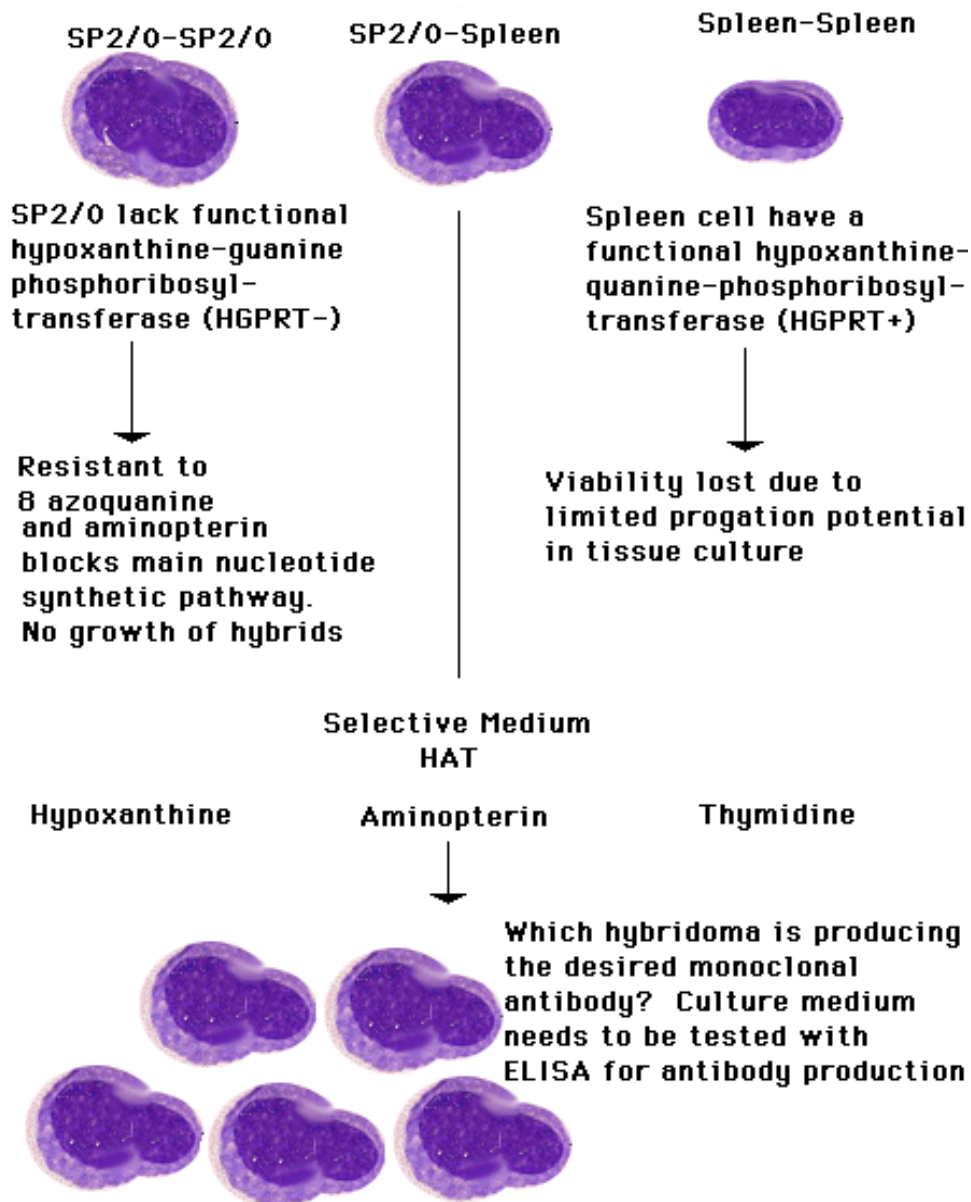


- “Immortal” growth properties of a myeloma cell
- Immunoglobulin producing properties of a normal B cell

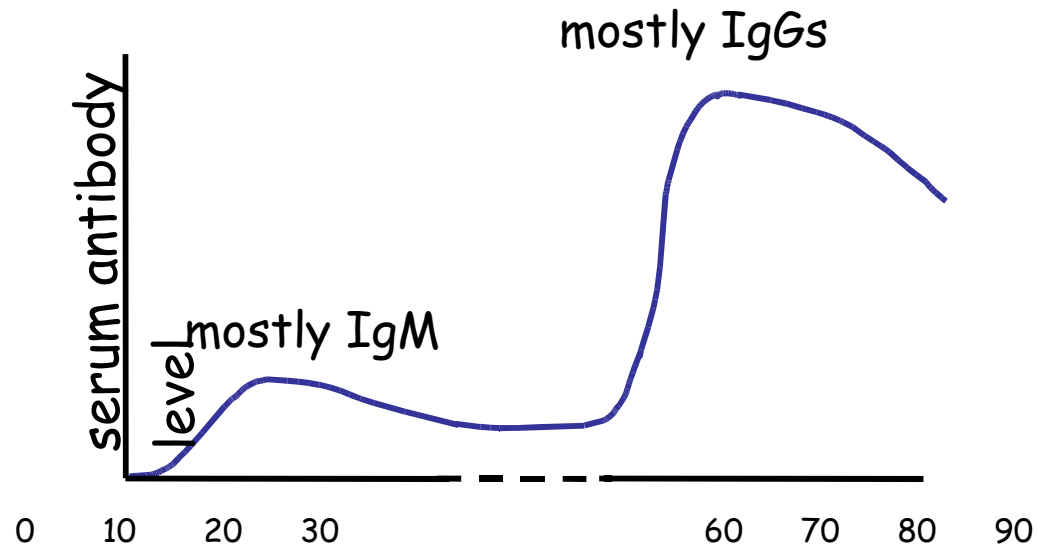
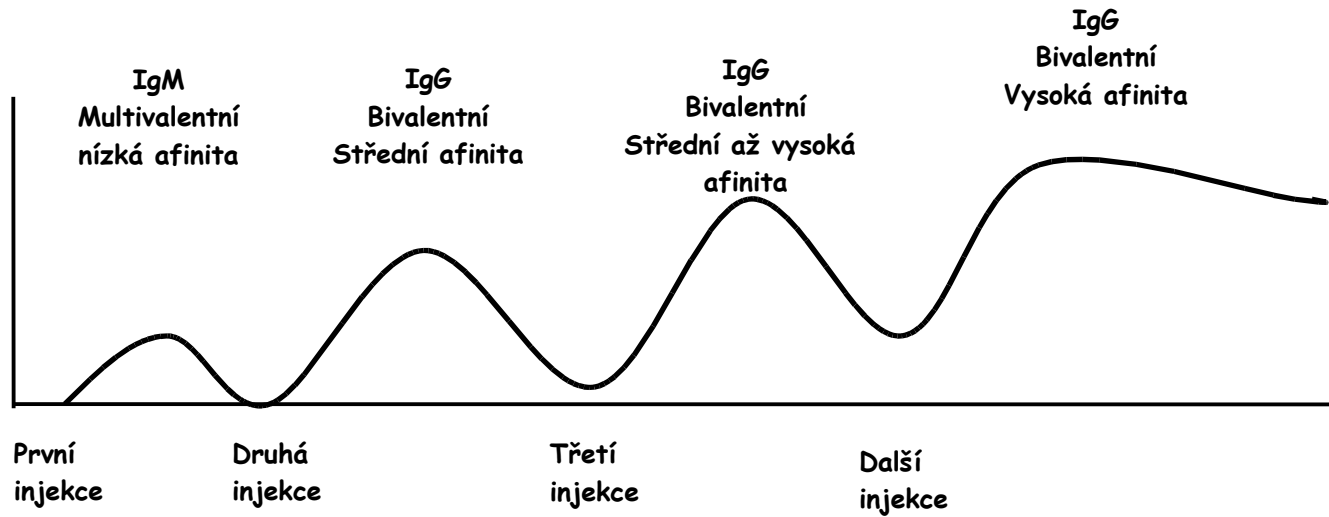
Hybridní buňka

Fúzování buněk z myší sleziny s myelomovými buňkami





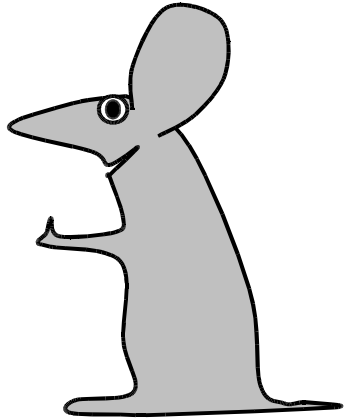
Primary and secondary immune response



Nejčastější dotazy vzhledem k imunizacím: věk myši a množství antigenu

Pro každý imunizační pokus používáme 4 myši- **60-80 dnů staré**

!!!!



Proteiny:

5-25 μ g proteinu/myš/injekce (je-li protein **< 40KDA**)

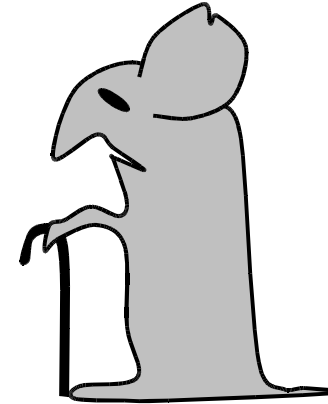
15-40 μ g proteinu/myš/injekce (je-li protein **> 40KDA**)

Peptidy:

9-15mer peptidy jsou nejvhodnější pro imunizace; čistota peptidů musí být **> 50%**.

1-15 μ g peptidu/myš/injekce [peptid vázaný na nosič KHL (celkem pro jednu injekci **15-40 μ g peptide-KLH**)]

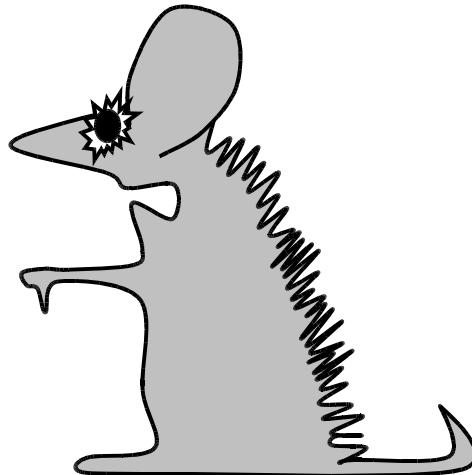
????



60-80 dnů staré myši jsou připraveny odpovídat velmi dobře při imunizacích.

Starší myši mohou být někdy použitelné pro imunizace, ale my je neradi používáme.

Já osobně nikdy nepoužívám větší dávku antigenu jak 40 μ g na injekci a myš



Nepředávkuje mě prosím!!!!!!!!!!

Immunization protocol

- 1) **First injection** – **day 1**: intraperitoneal injection of 1 – 40 μ g of antigen (in complete Freund's adjuvant).
- 1) **Second injection** – **day 21**: intraperitoneal injection of 1 – 40 μ g of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvant).
- 3) **Third injection** – **day 42**: intraperitoneal injection of 1 – 40 μ g of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvant).
- 4) **Fourth injection** – **day 43**: intraperitoneal injection of 10 μ g of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvant).
- 5) **Fifth injection** – **day 45**: intraperitoneal injection of 10 μ g of purified protein or peptide coupled to KLH (in PBS).
- 6) **Fusion** – **day 47** (protocol for production of monoclonal antibodies).

Antigen (GST-MDM-2) for immunization of 5 mice:

Contact person:

Borek Vojtesek (tel: , e-mail:)

4 tubes in total for 4 injections of antigen (1st injection plus 3 boosts)

Each tube contain **X-XX μ g/ml** of antigen

Each tube is for immunization of 5 mice (100 μ l per mouse)

Immunization schedule:

14. 11. 2005: 1st Injection of antigen

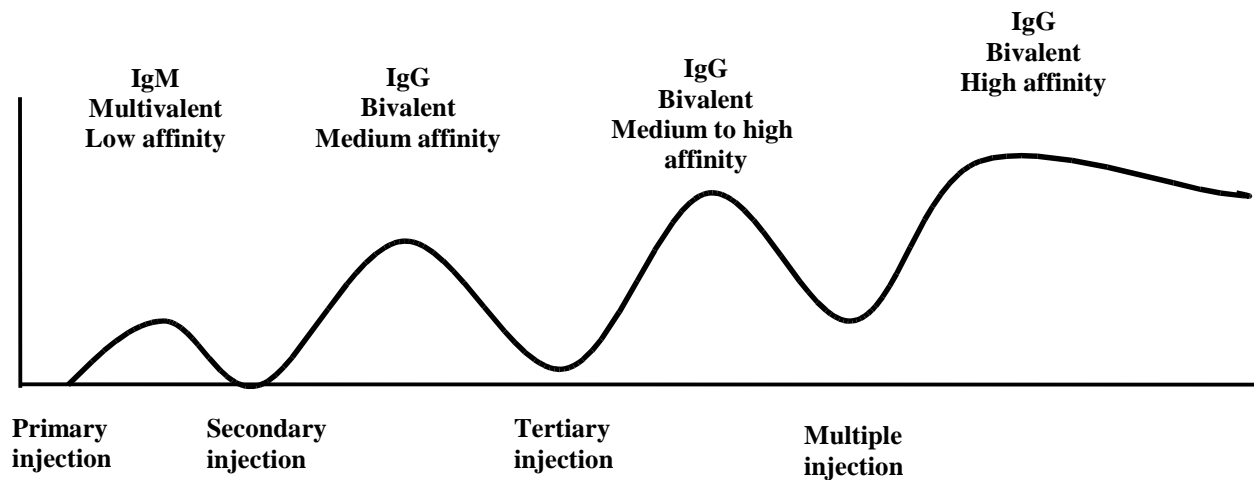
05. 12. 2005: 1st Boost

09. 12. 2005 **1st Bleed**

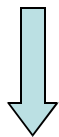
26. 12. 2005 2nd Boost

02. 01. 2006 **2nd Bleed**

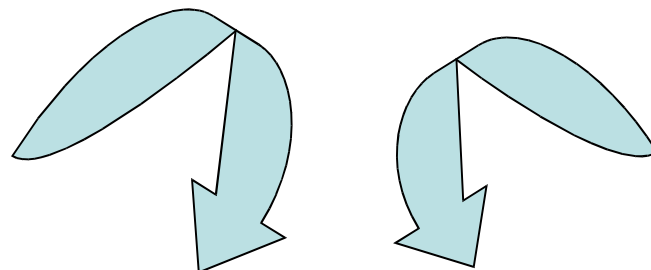
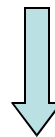
More injection will be decided after testing animal response to antigen.



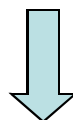
**Vyjmout slezinu a uvolnit
slezinné buňky (10^6 buněk)**



**Spočítat zdravé myelomové
buňky (10^7 buněk)**



Smíchat buňky a promýt



Přidat PEG, 30-60%, 1-6 min. Stále protřepávat.



Velmi jemně naředit fúzovanou směs buněk do 50 ml selekčního média. Vysadit buňky na misky.

Selekce vhodných protilátek

- **Selekce protilátek, které potřebujete pro svoji práci**

Skrining s využitím technik, ke kterým chceme protilátky využívat.

- **Primární skrining**

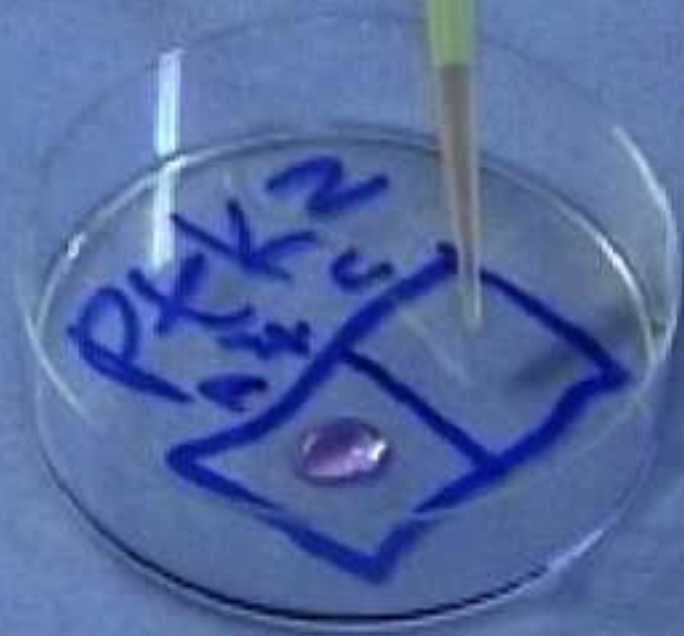
- Musí to být rychle proveditelné metody.

- **Sekundární skrining**

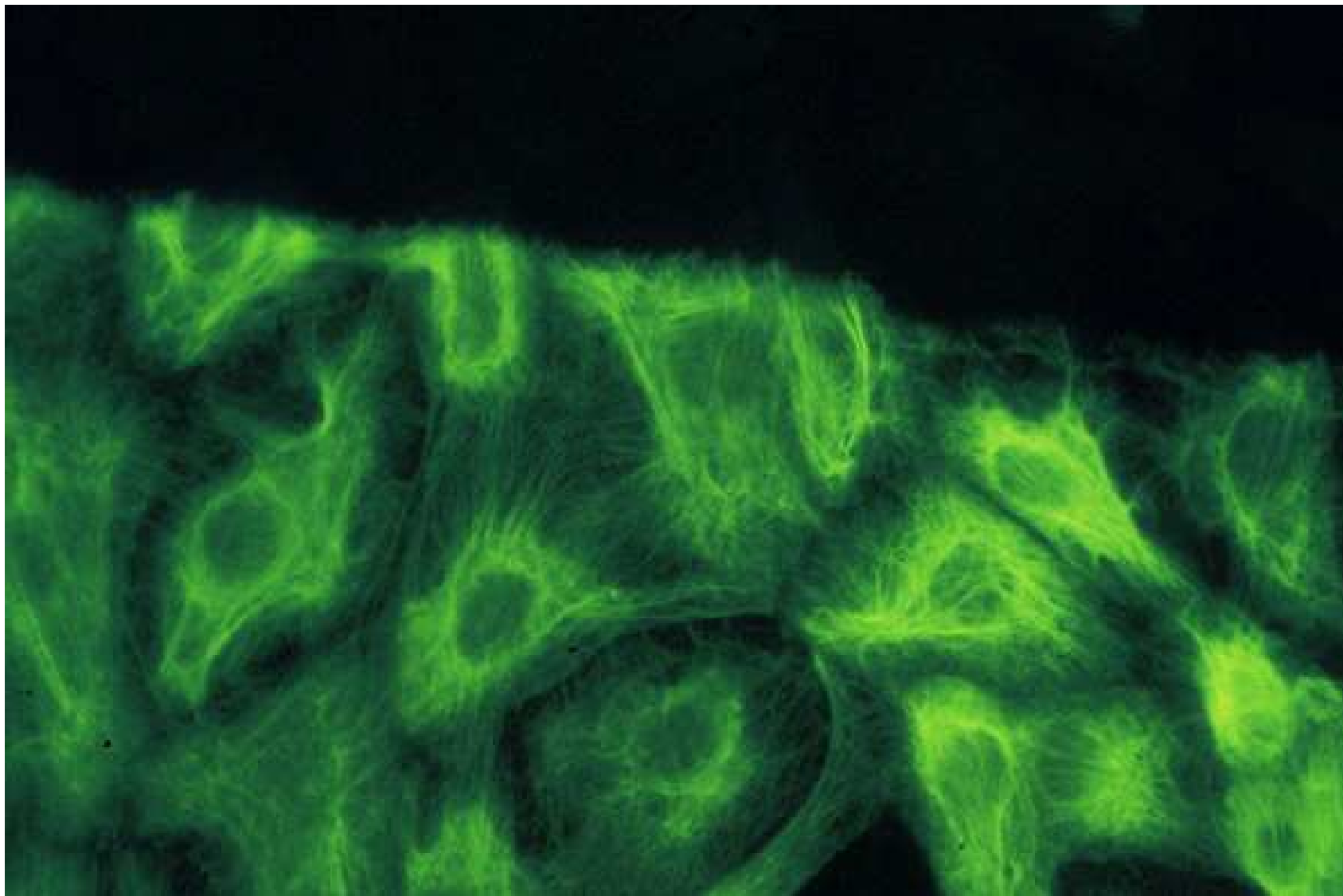
- Mohou být složitější metody, více selektivní. Pracujeme s menším množstvím vzorků, ale s většími objemy.

Skrínigové metody: mikrotesty

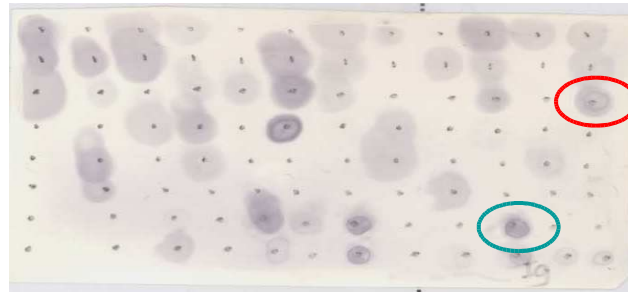




Skríningové metody: mikrotesty



Screening strategy for antibodies developed against the GST-protein



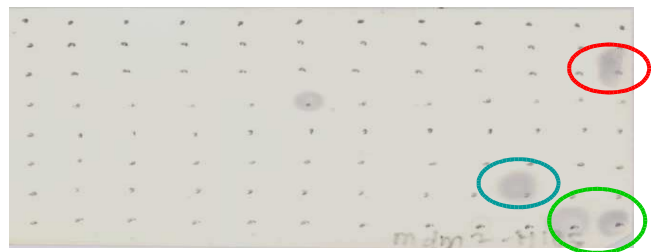
IgG level



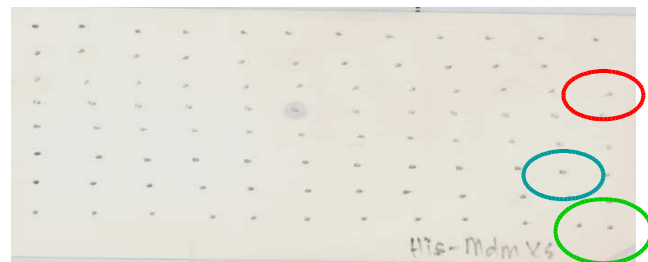
GST-MDM2



GST-MDMX

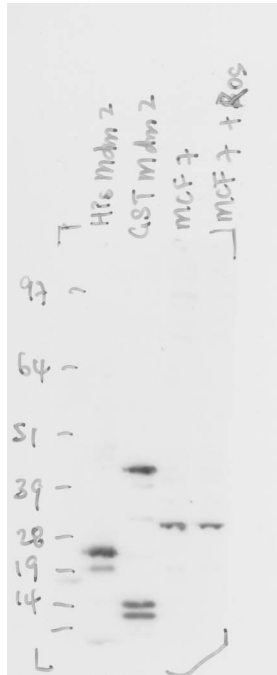


HIS-MDM2

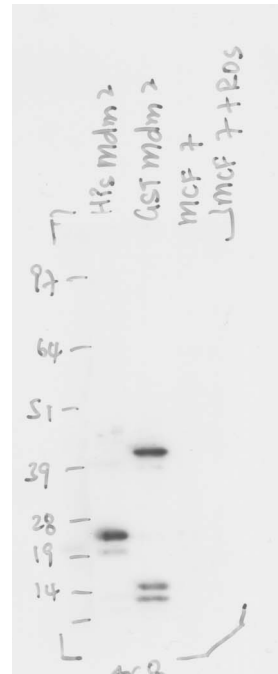


HIS-MDMX

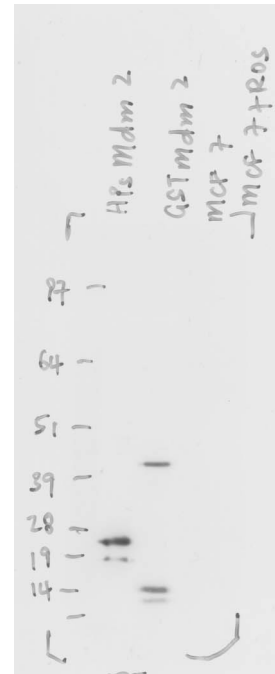
Results of screening of MDM-2 (Western Blot)



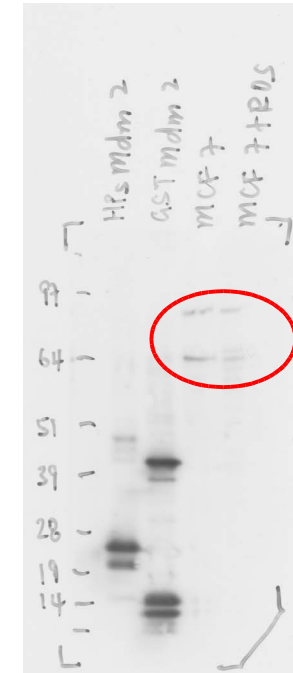
7G8



4C8

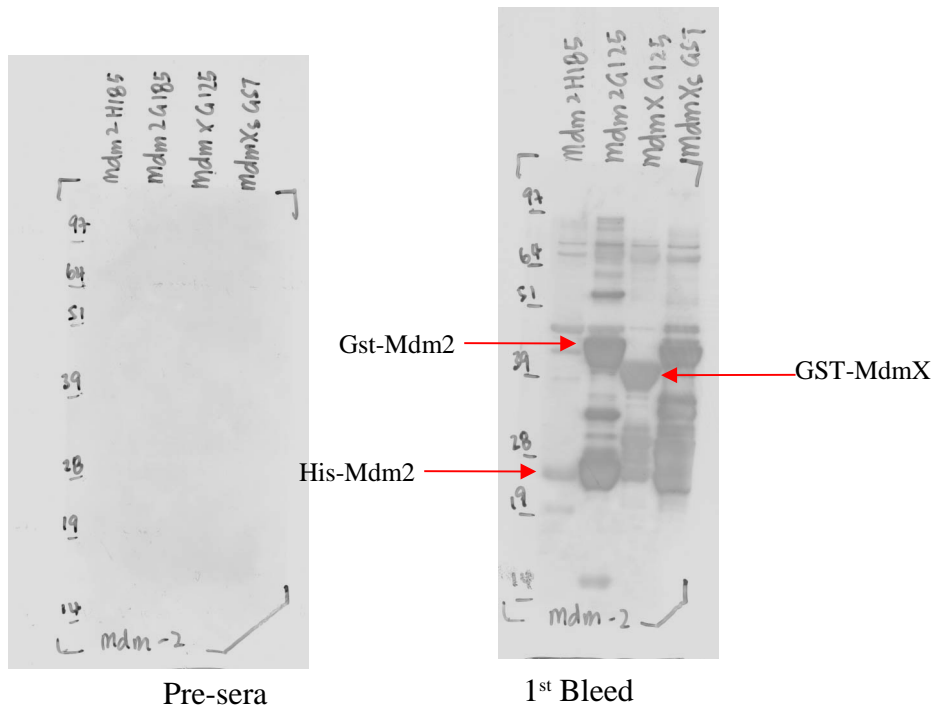


1D5

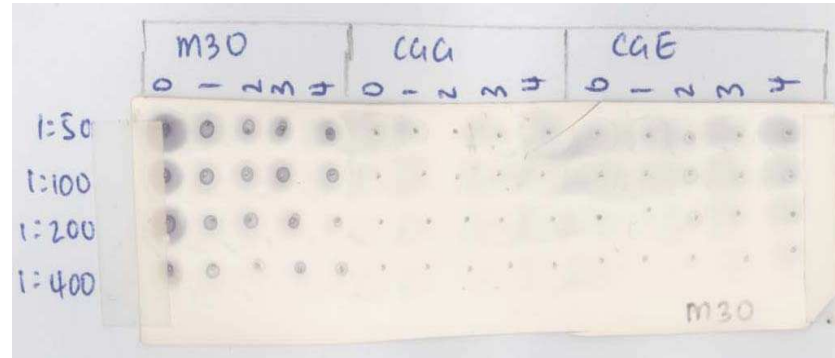


4B2/2A9

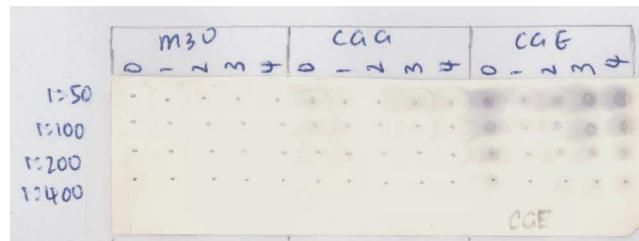
POSITIVE CONTROL



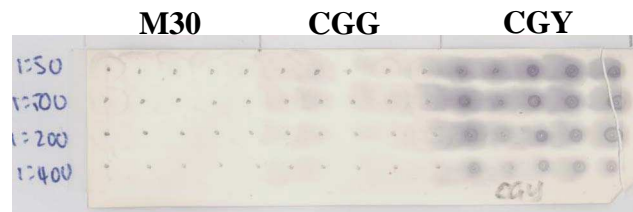
Mdm-2



M30 peptide

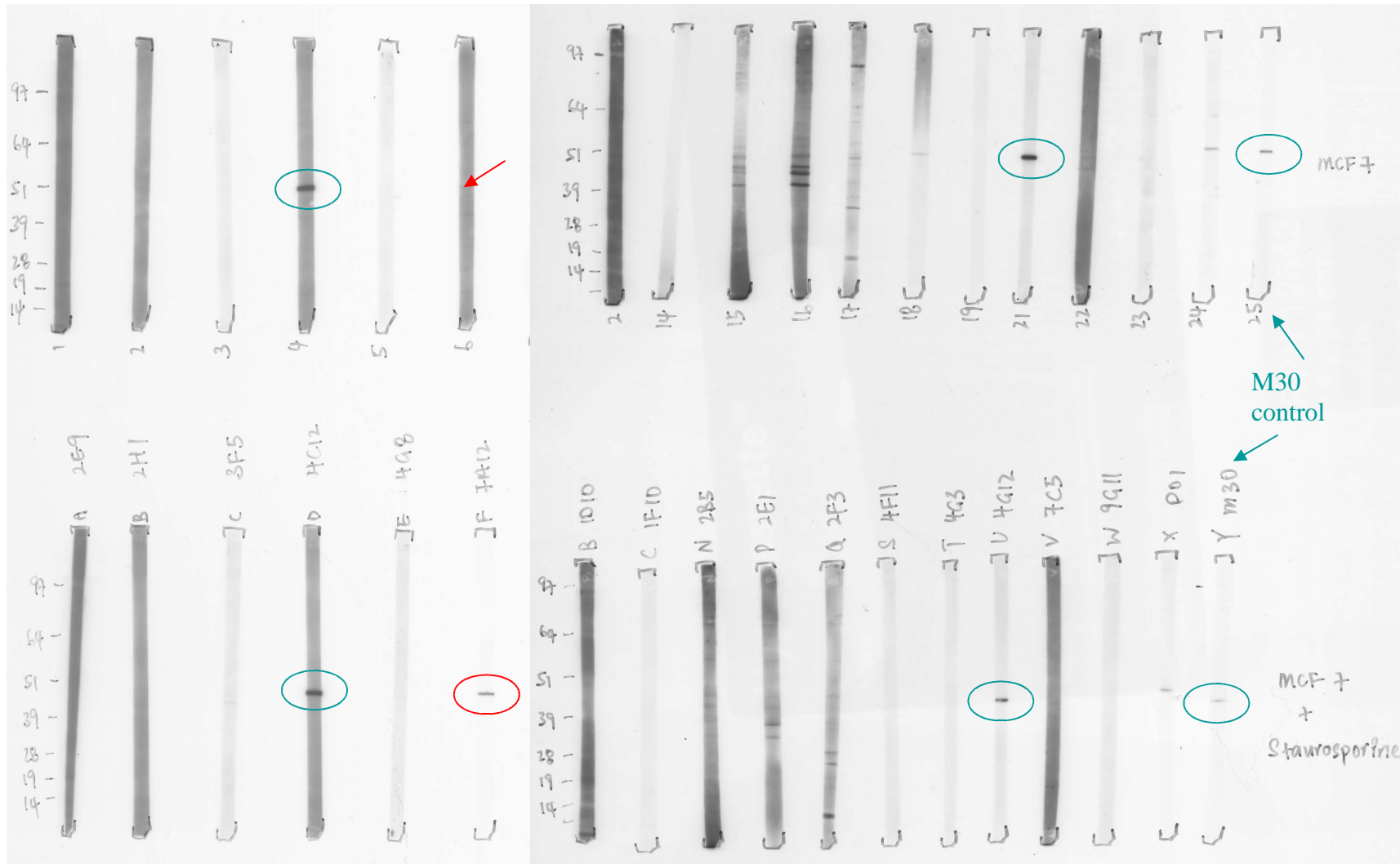


CGE-flag peptide

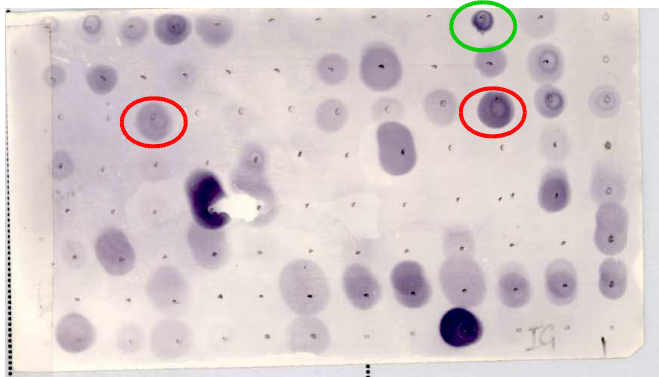


CGY-T7 tag peptide

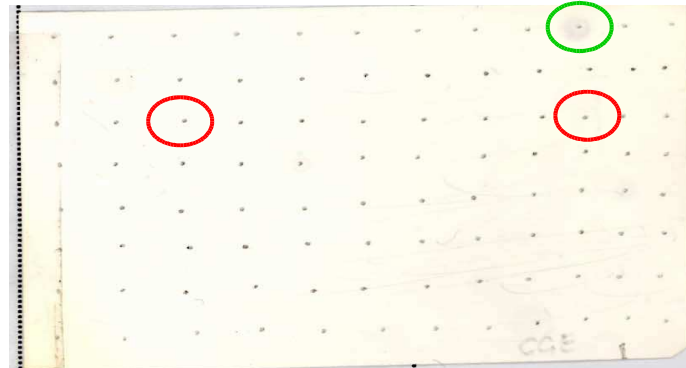
Results of screening of [LLEDGEDFNLGDALD [keratin 18 (M30)]



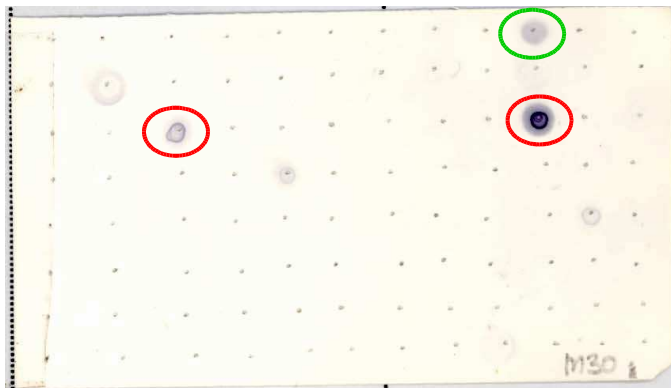
Screening strategy for antibodies developed against the peptide



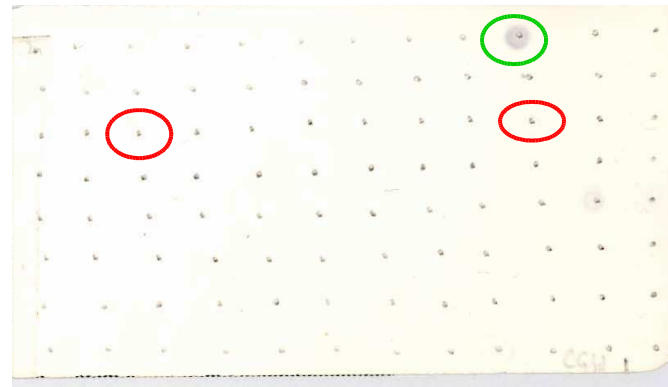
IgG



CGE-peptide



M30-peptide



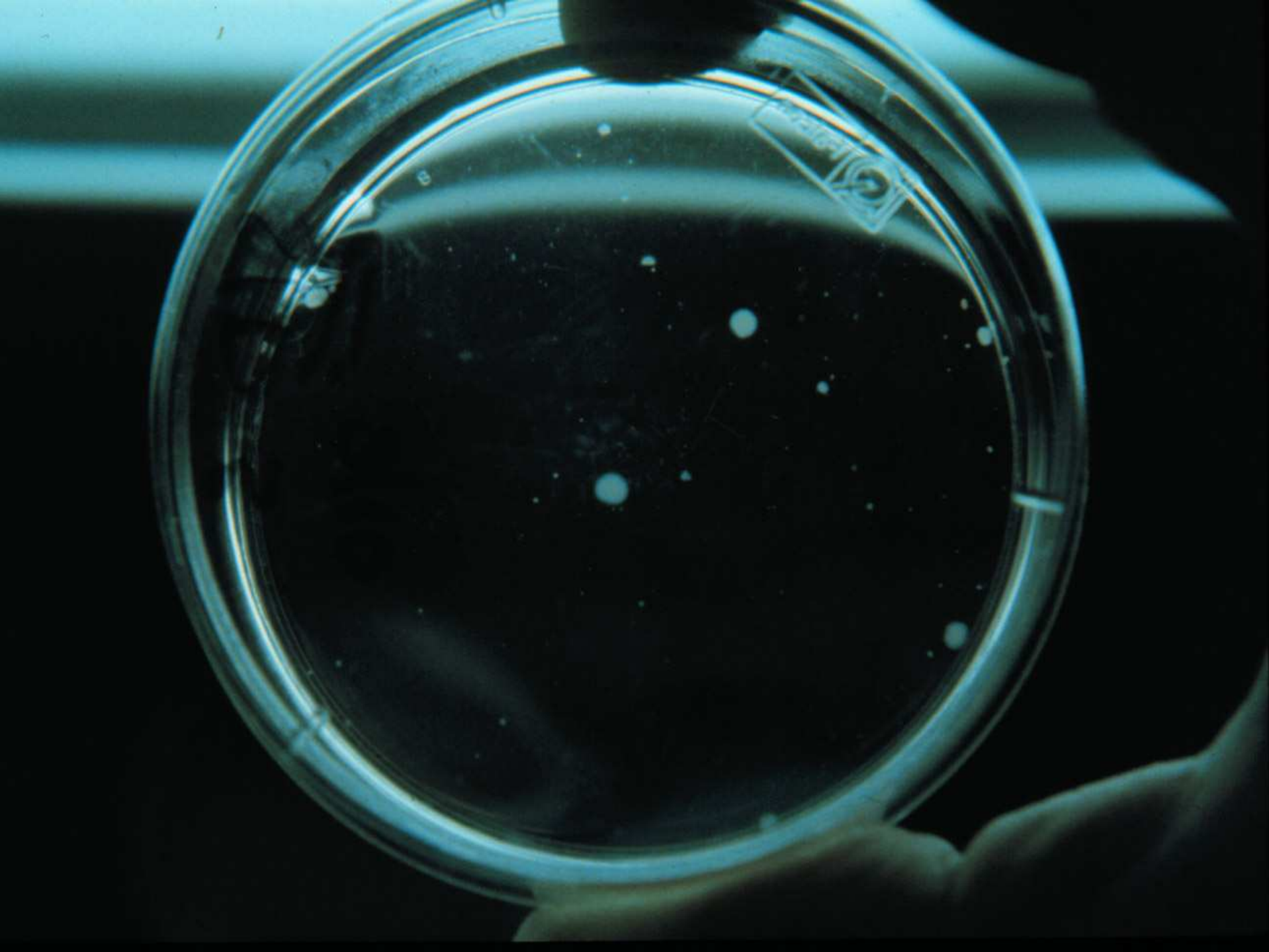
CGY-peptide

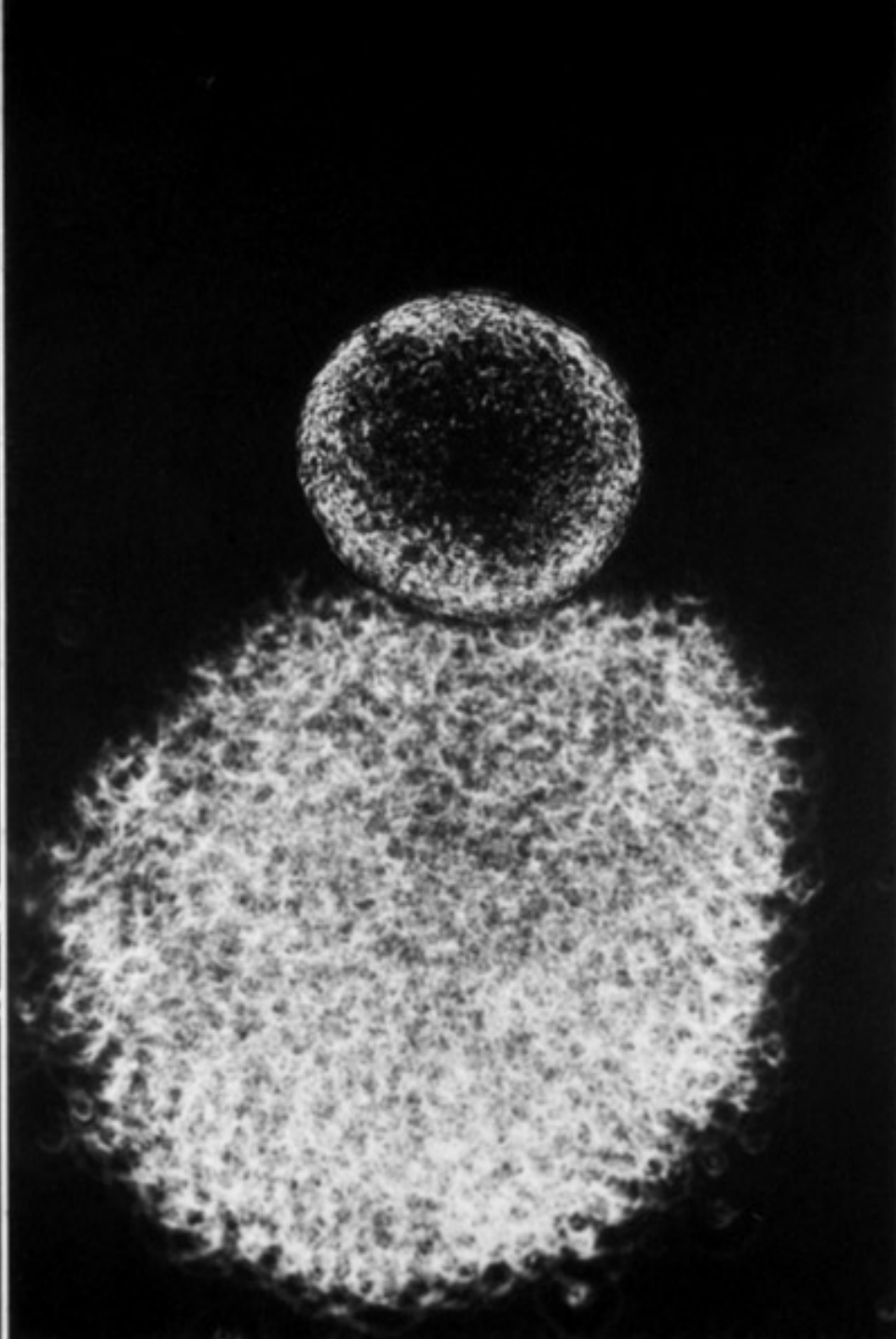
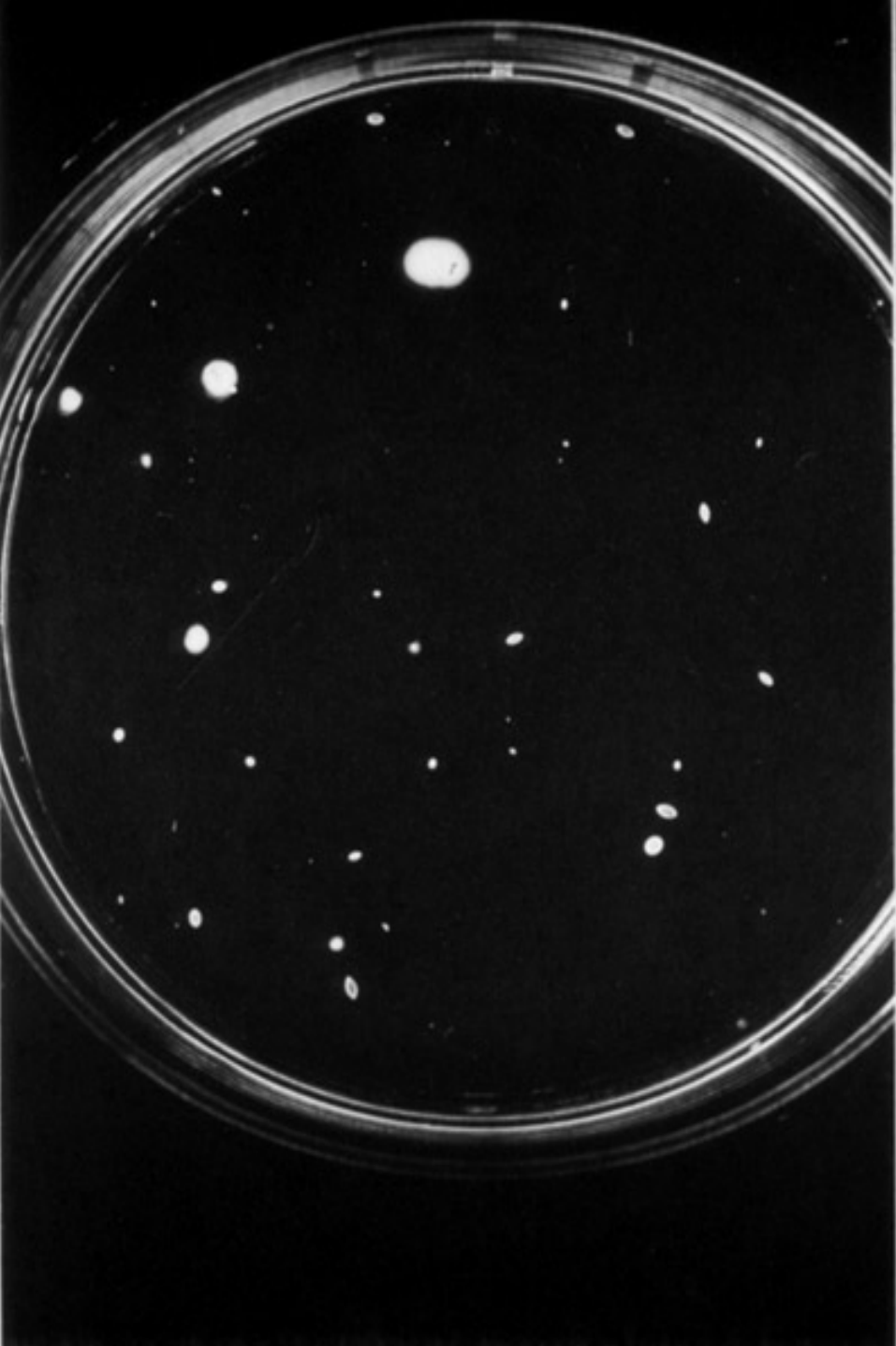
„Single cell“ klonování

- Oddělit od sebe správně a nesprávně fúzované buňky
- Výběr stabilních hybridomových linií

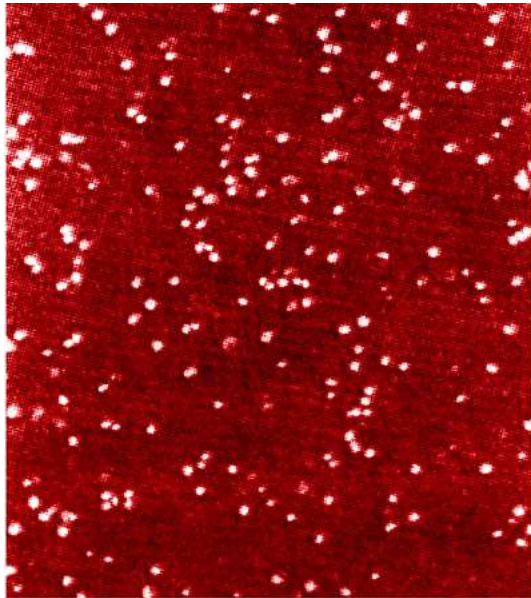
Klonovací metody

- Výsev přímo fúzovaných buněk do polotuhého agaru
- Vyředěním pozitivních hybridomů
 - do agaru
 - do mikroděstiček
- Separováním kolonií před skríníngem
- Výběr jednotlivých kolonií pod mikroskopem

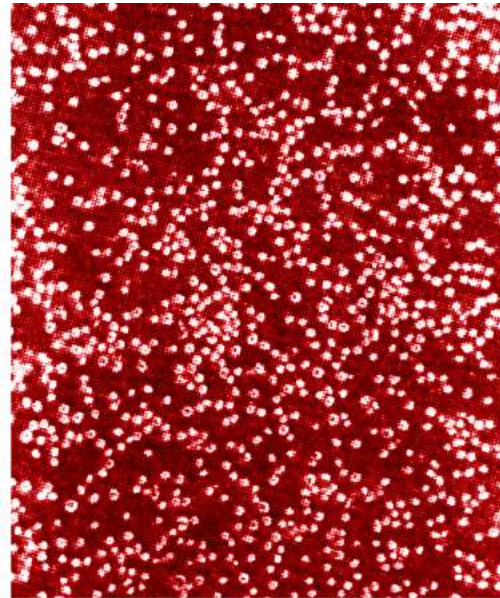




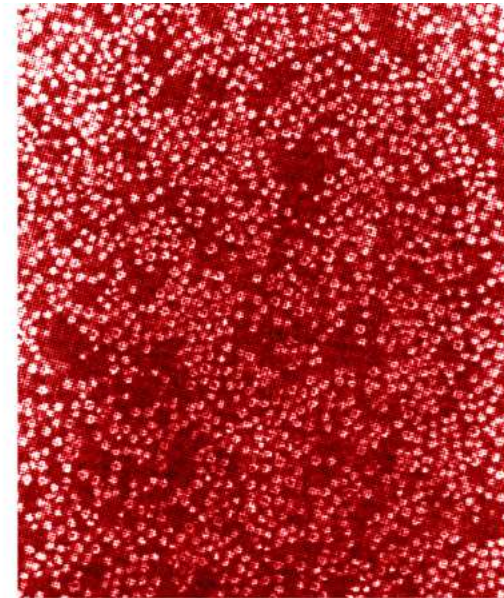
Hybridomy rostou velmi rychle,
téměř jako neadherentní buňky



Zrovna „vysazené“
buňky



Dvou až třídenní
kultivace



Téměř „přerostlé“
buňky. Je nutné je
vyředit.

Charakterizace monoklonálních protilátek

- Třída a podtřída imunoglobulinů (IgM; IgG1, IgG2a, IgG2b, etc)
- Stabilita při skladování
- Rozlišování antigenů:
 - Imunofluorescence (subcellulární lokalizace)
 - Imunohistochemie (tkáňová distribuce)
 - Immunoblotting (molekulová hmotnost)
 - Immunoprecipitace (interakce s cílovým antigenem)
- mezidruhová “cross-reactivity“

Charakterizace monoklonálních protilátek

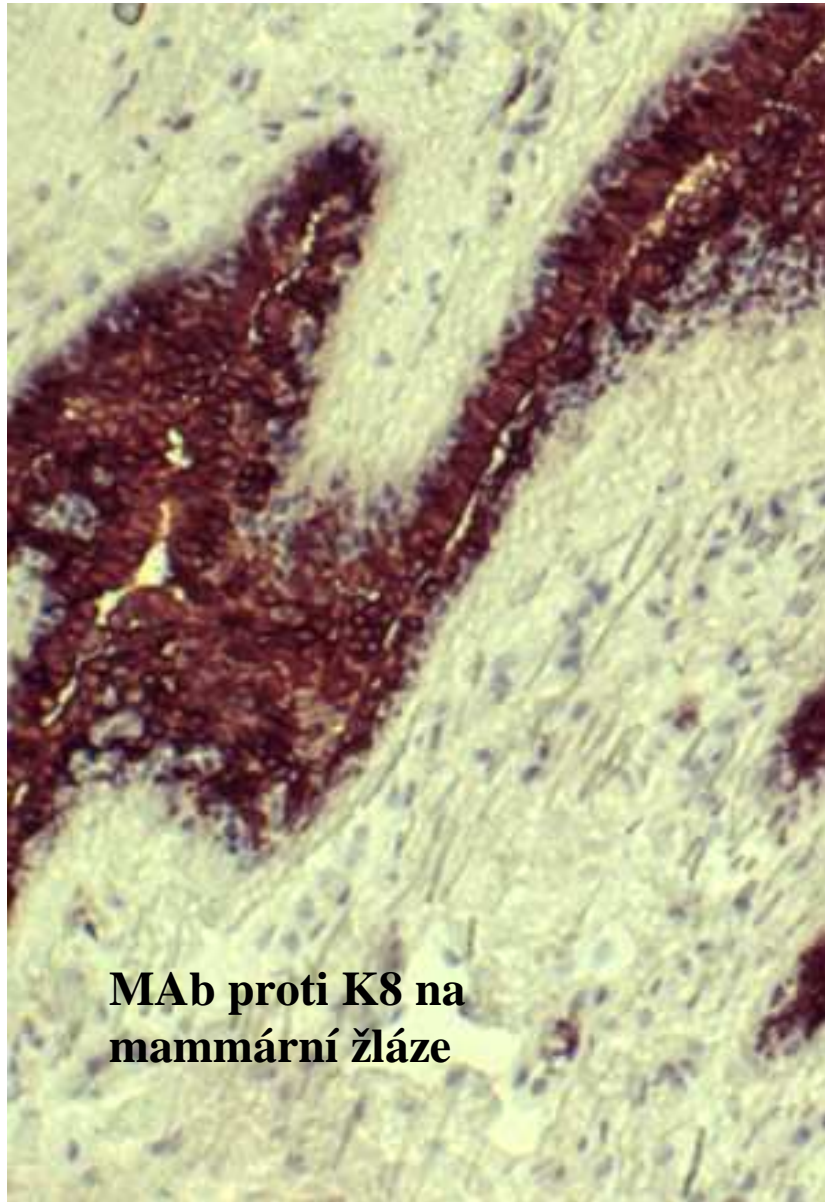
*Protilátky jsou tak dobré jak dobře jsou
charakterizované!!!!*

Využití monoklonálních protilátek

- MAb jsou fantastickým nástrojem pro buněčnou a molekulární biologii
 - **Imunofluorescenční nebo imunoperoxidázová mikroskopie pro detekci specifických proteinů v buňkách a tkáních**

(Imunohistochemie nebo imunocytochemie)



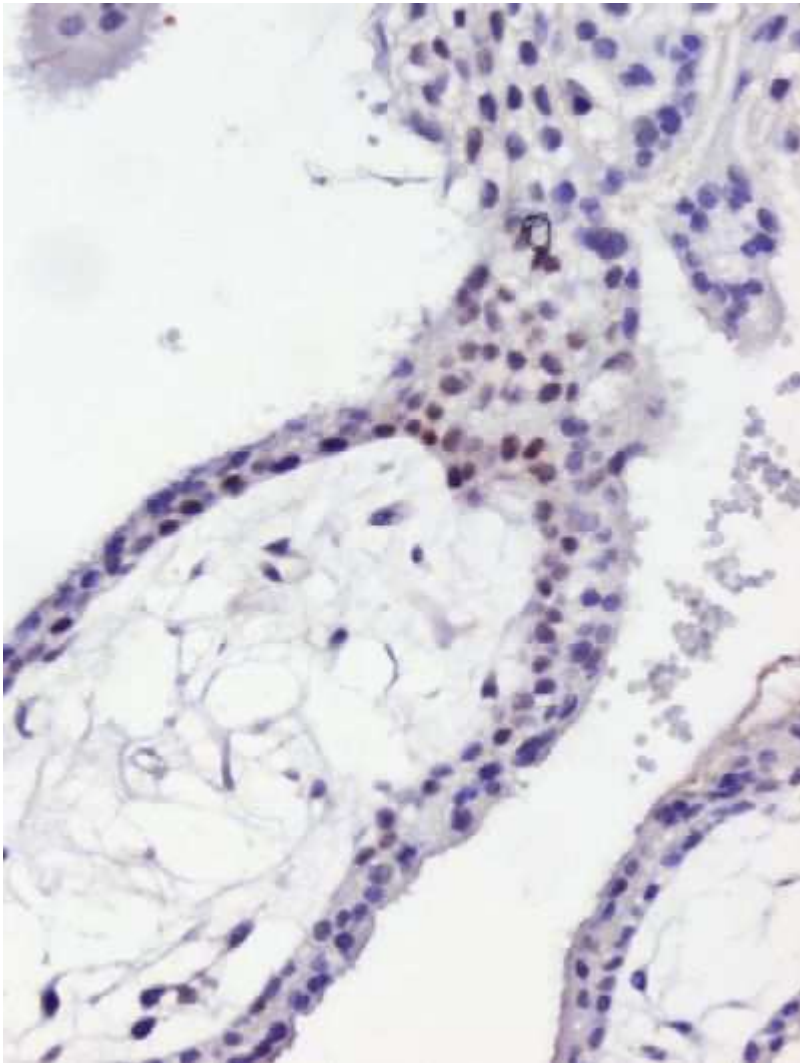


**MAb proti K8 na
mammární žláze**

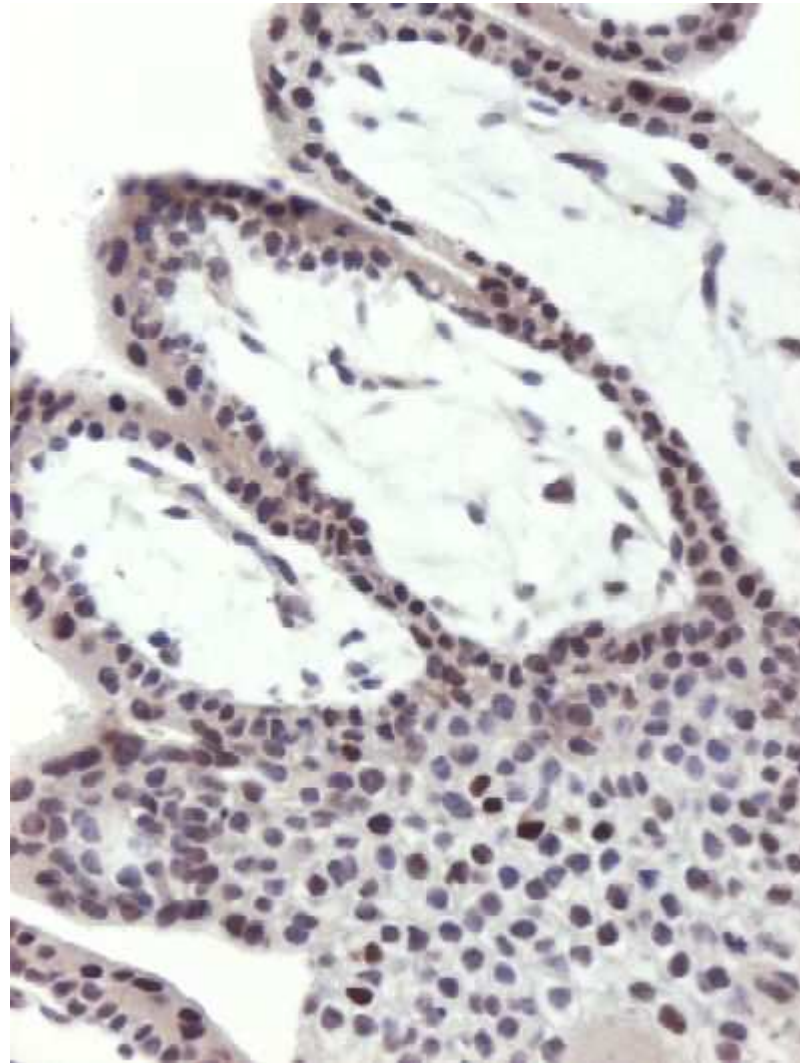


**MAb proti K14
na mammární
žláze**

All new hybridomas tested for recognition of target antigen in trophoblast

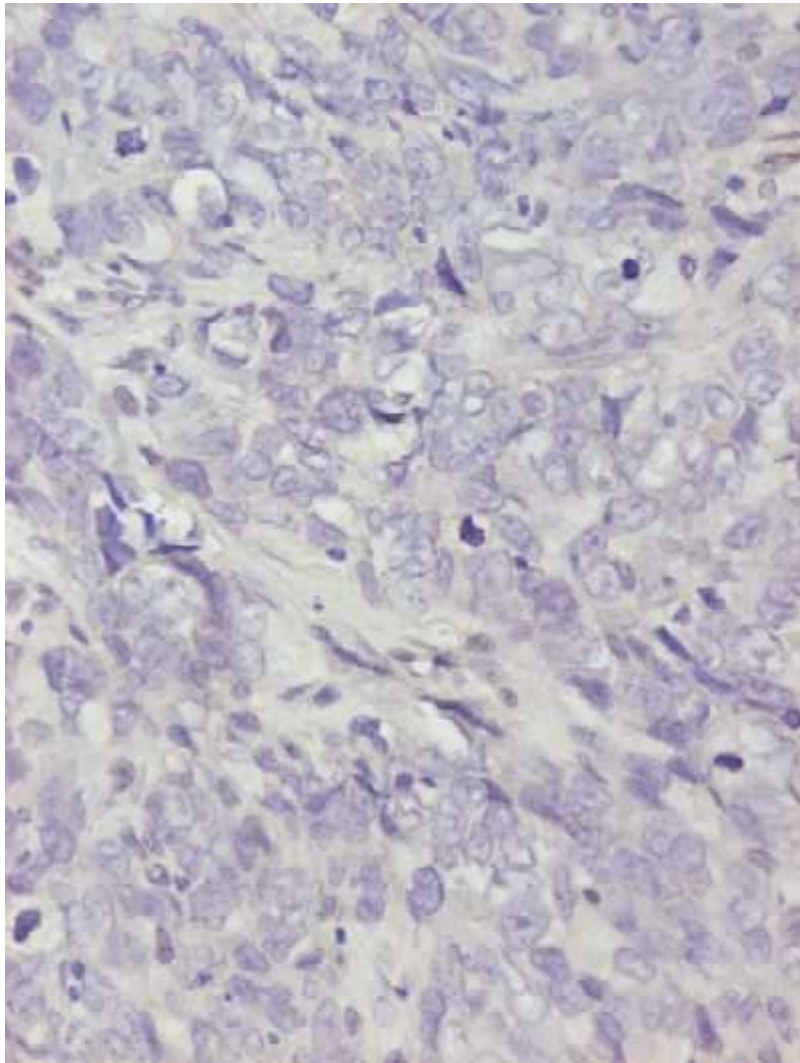


DO-1 (p53)

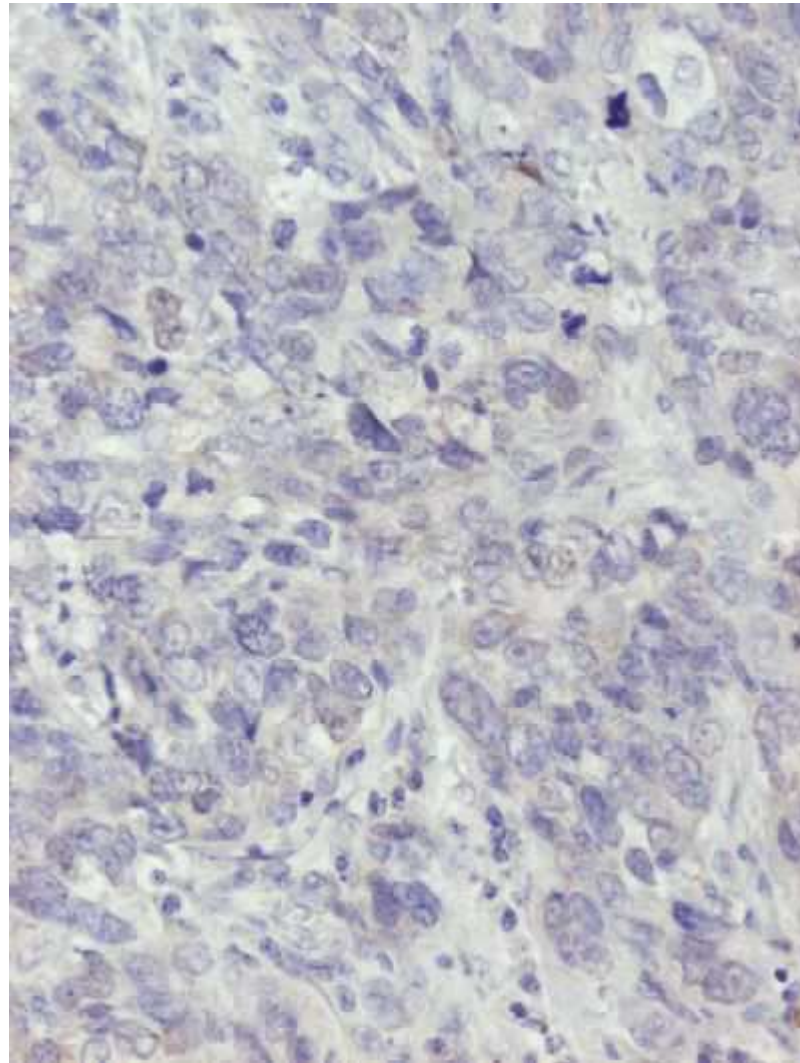


MDM2

p53 not detected with DO-1, no induction of MDM2

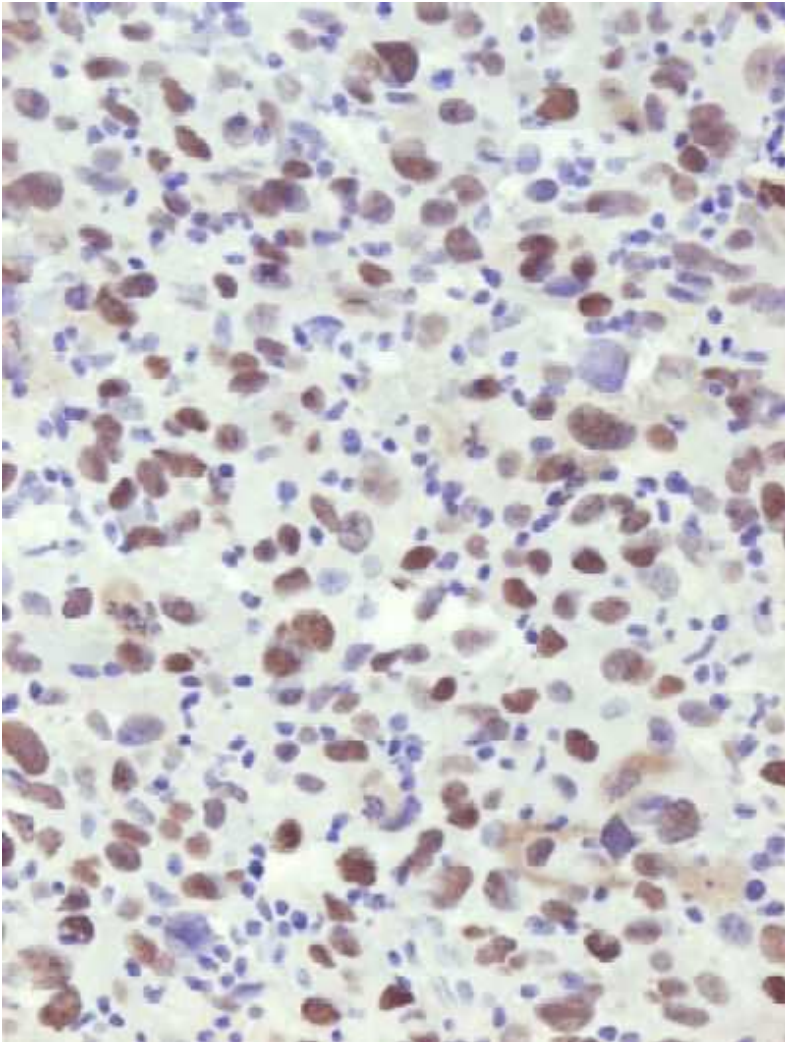


DO-1 (p53) negative

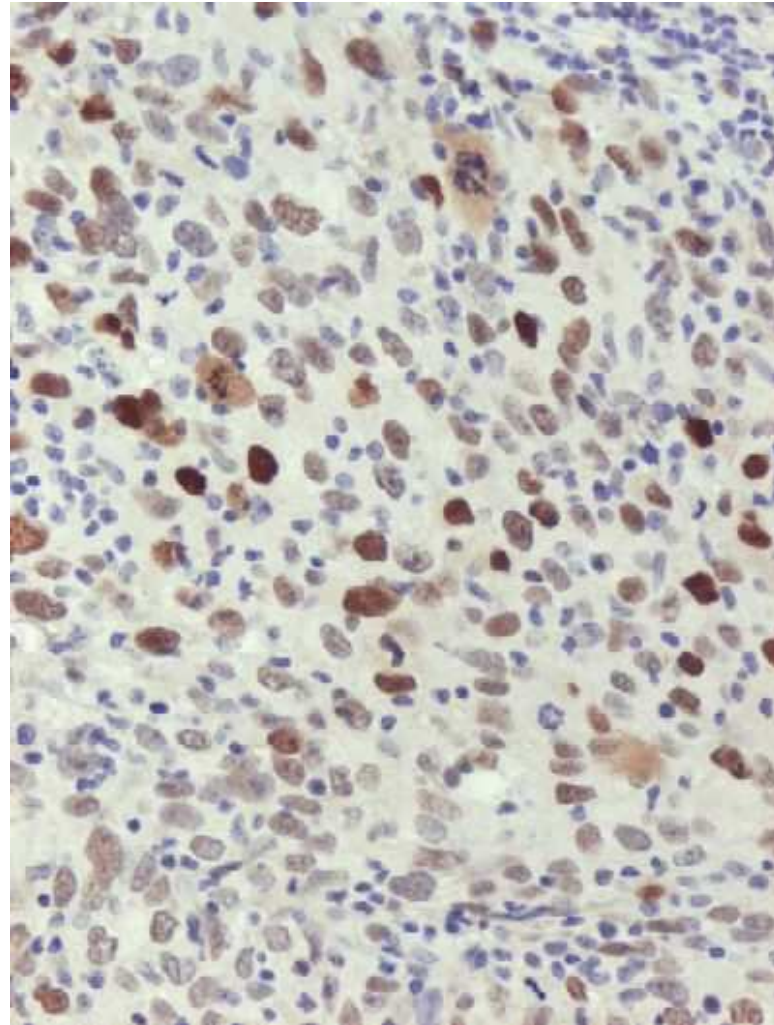


MDM2 negative

Intensive staining of p53 with induction of MDM2



DO-1 (p53) strong staining

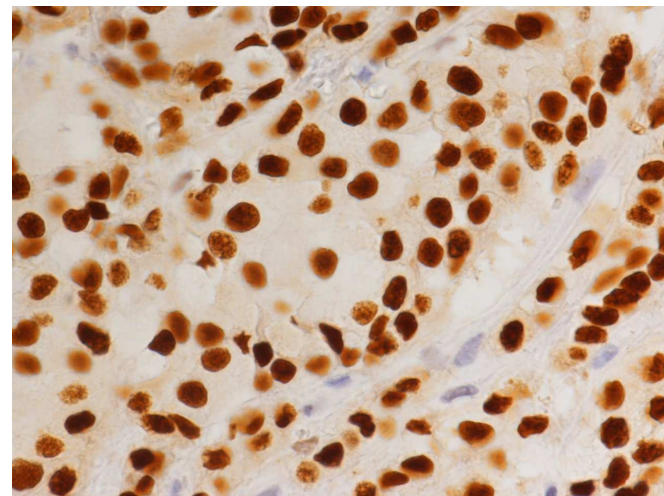
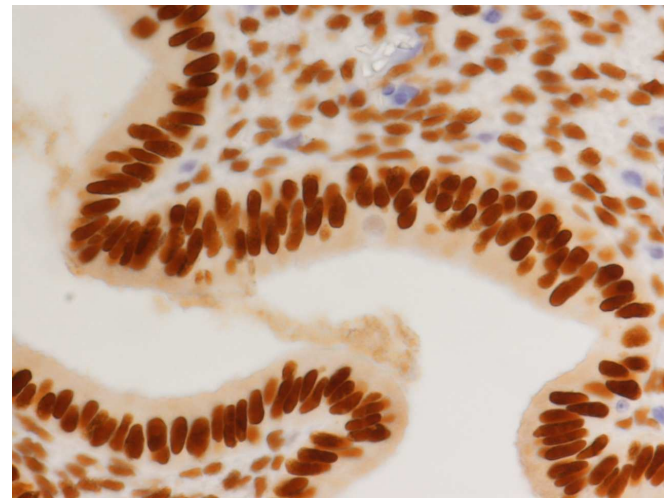
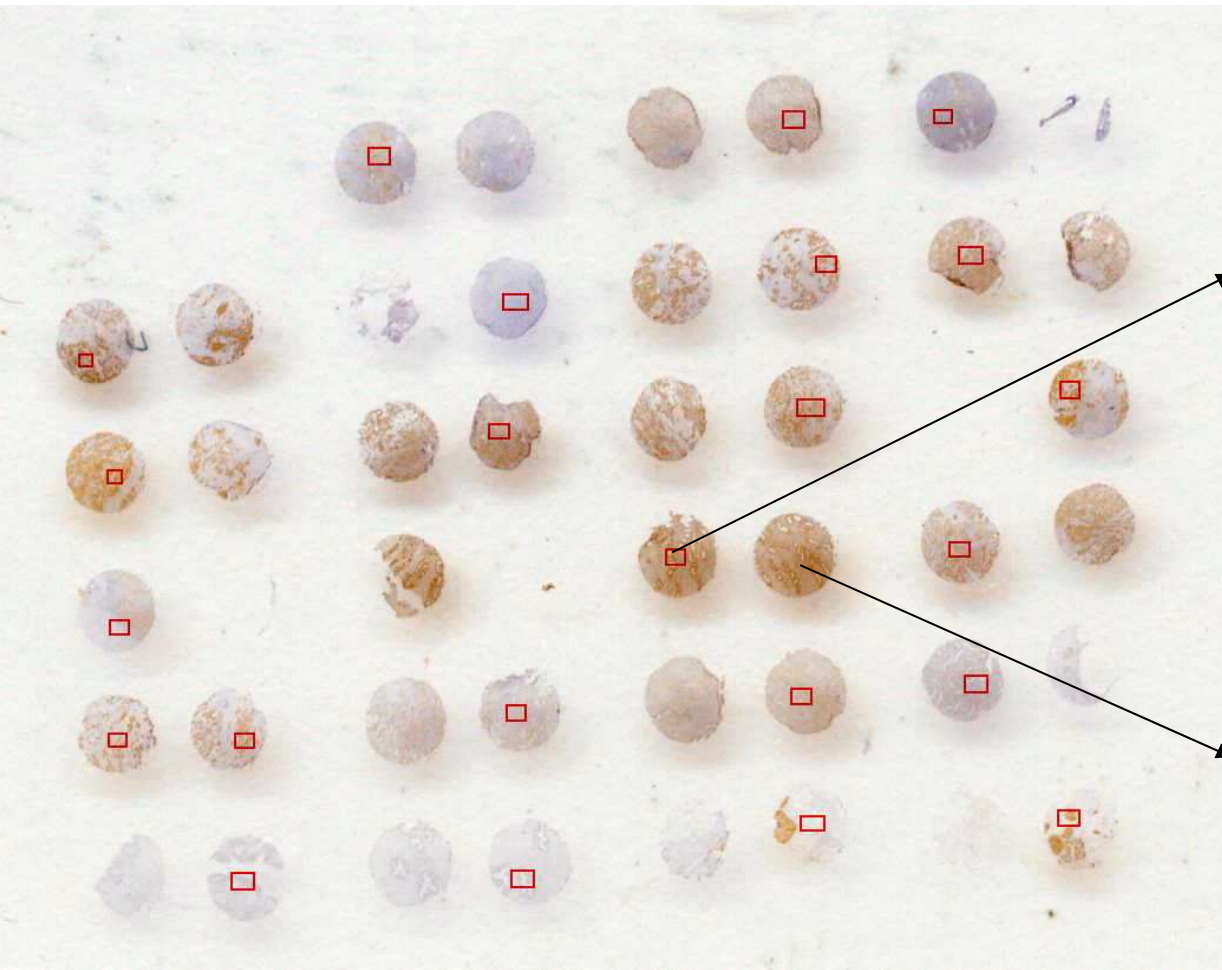


MDM2 - strong staining

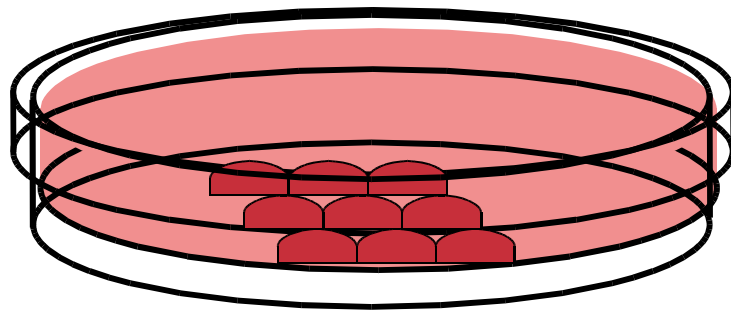
Immunohistochemistry testing of antibodies in tissue microarrays



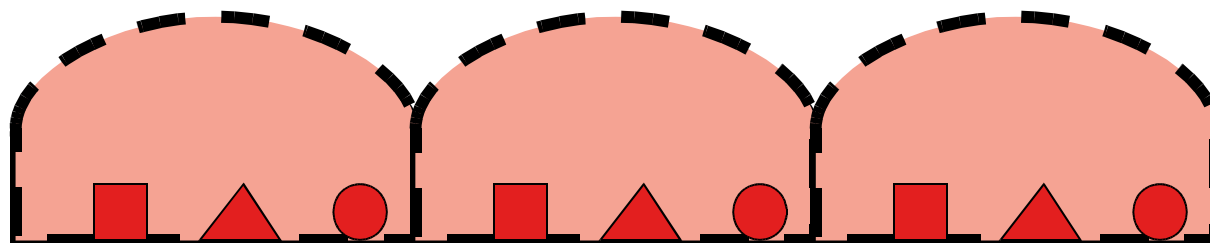
The antibody can be tested on different tissues at the same conditions

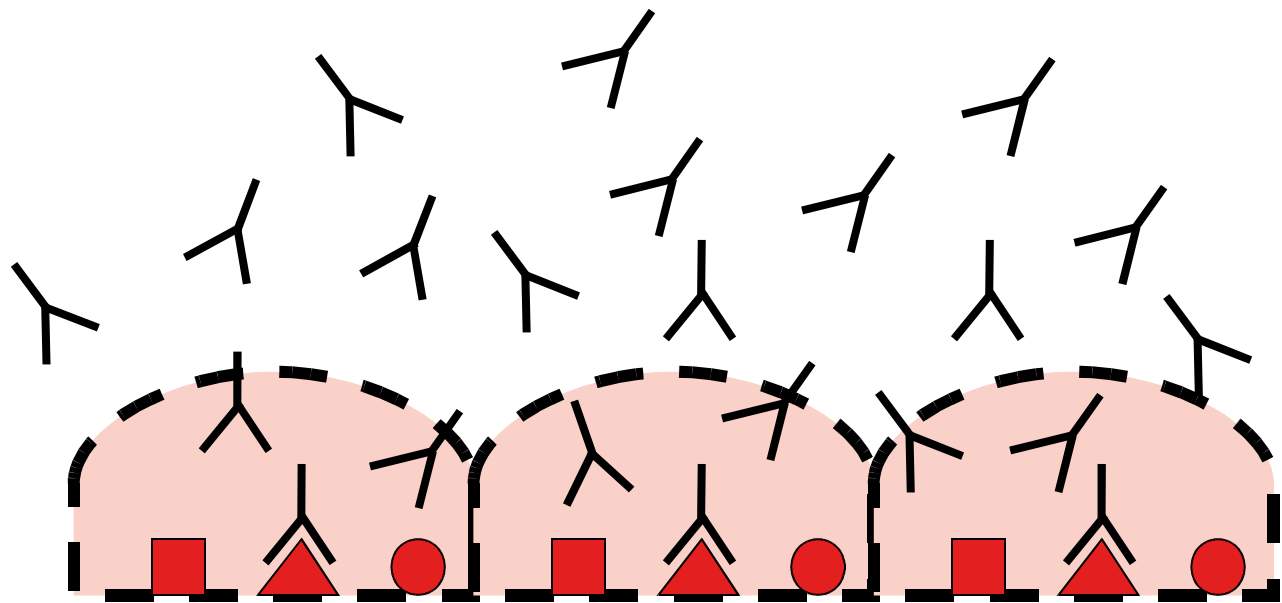


Barvení buněk protilátkami

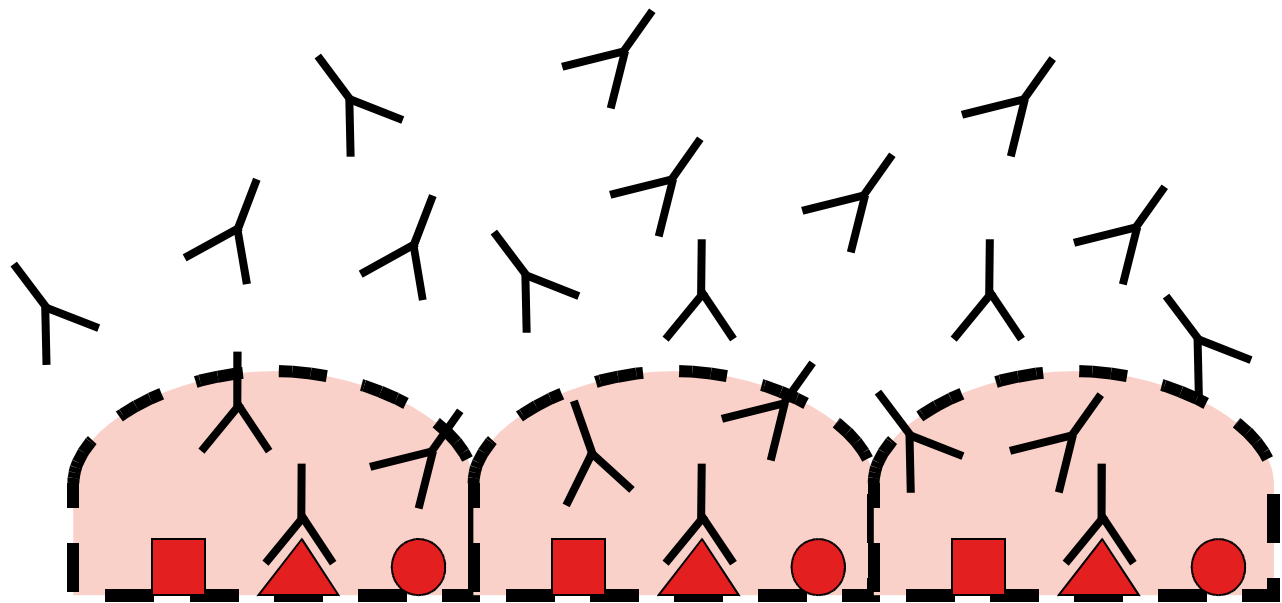


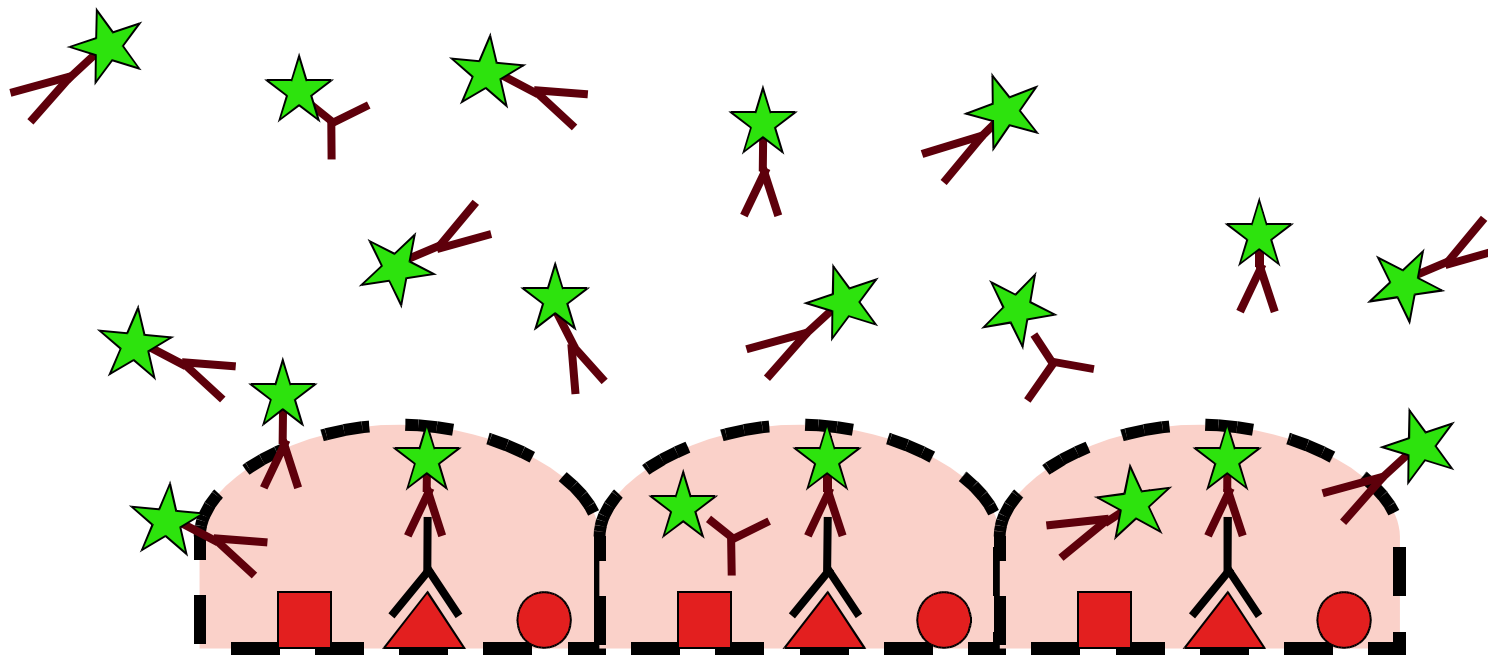
Fixace buněk roztokem metanolu/acetonu je jednou z možných metod permeabilizace jejich membrány



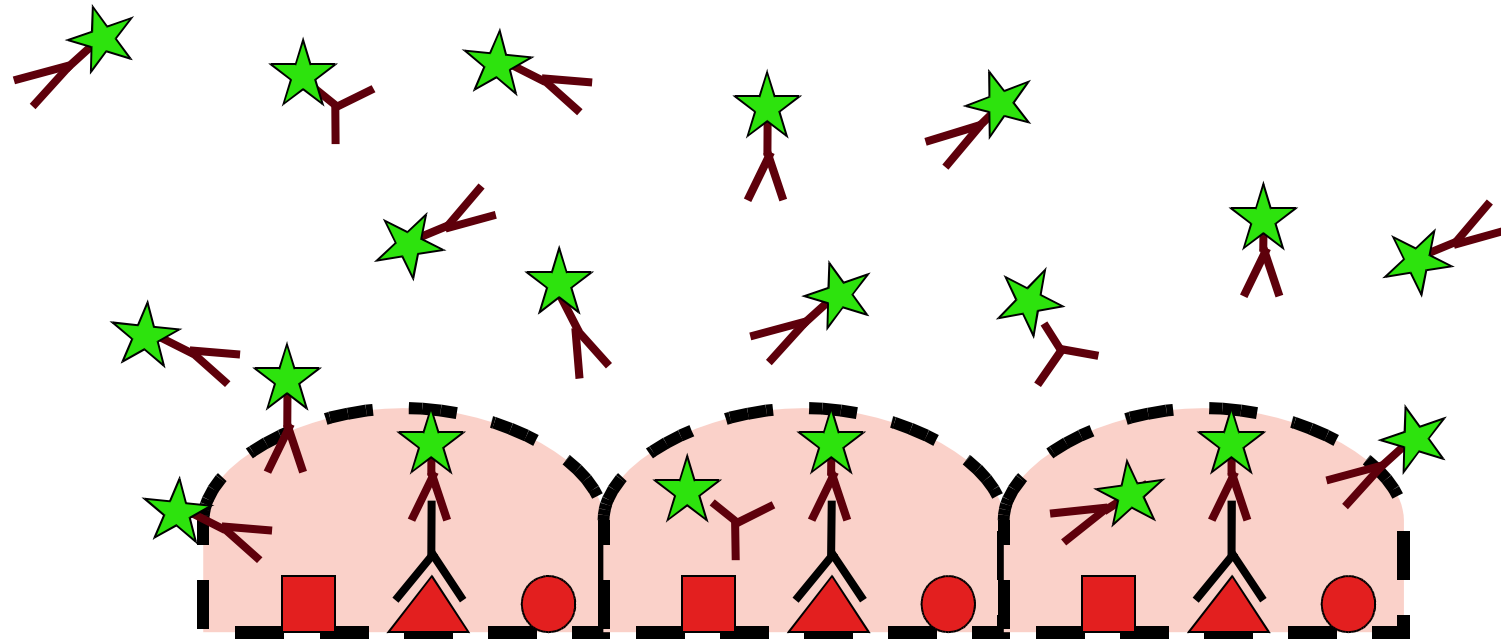


Přidání protilátek zaměřených proti specifickému antigenu

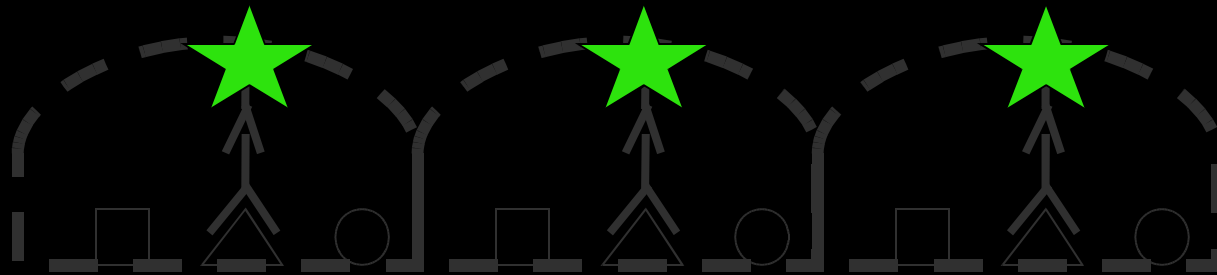


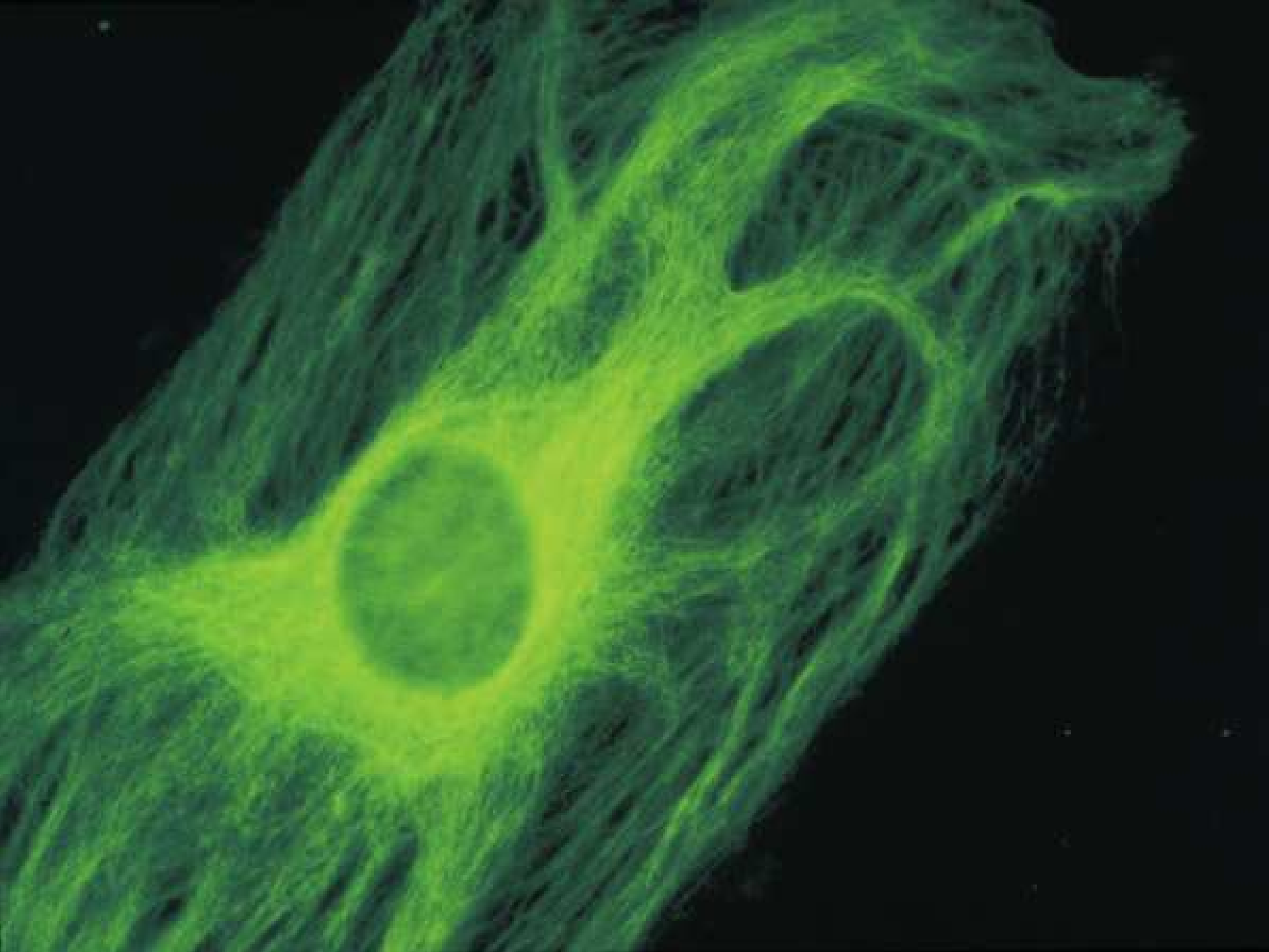


Přidání značené sekundární protilátky

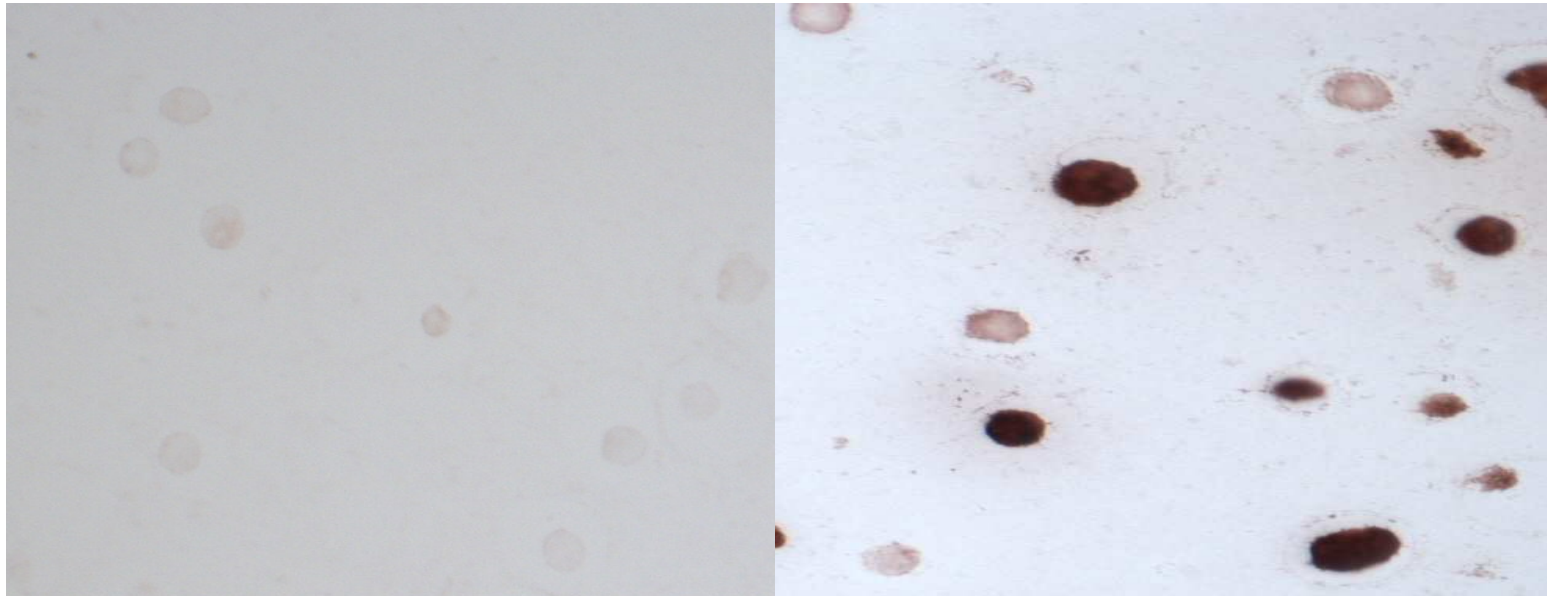


UV illumination - immunofluorescence





Immunocytochemistry

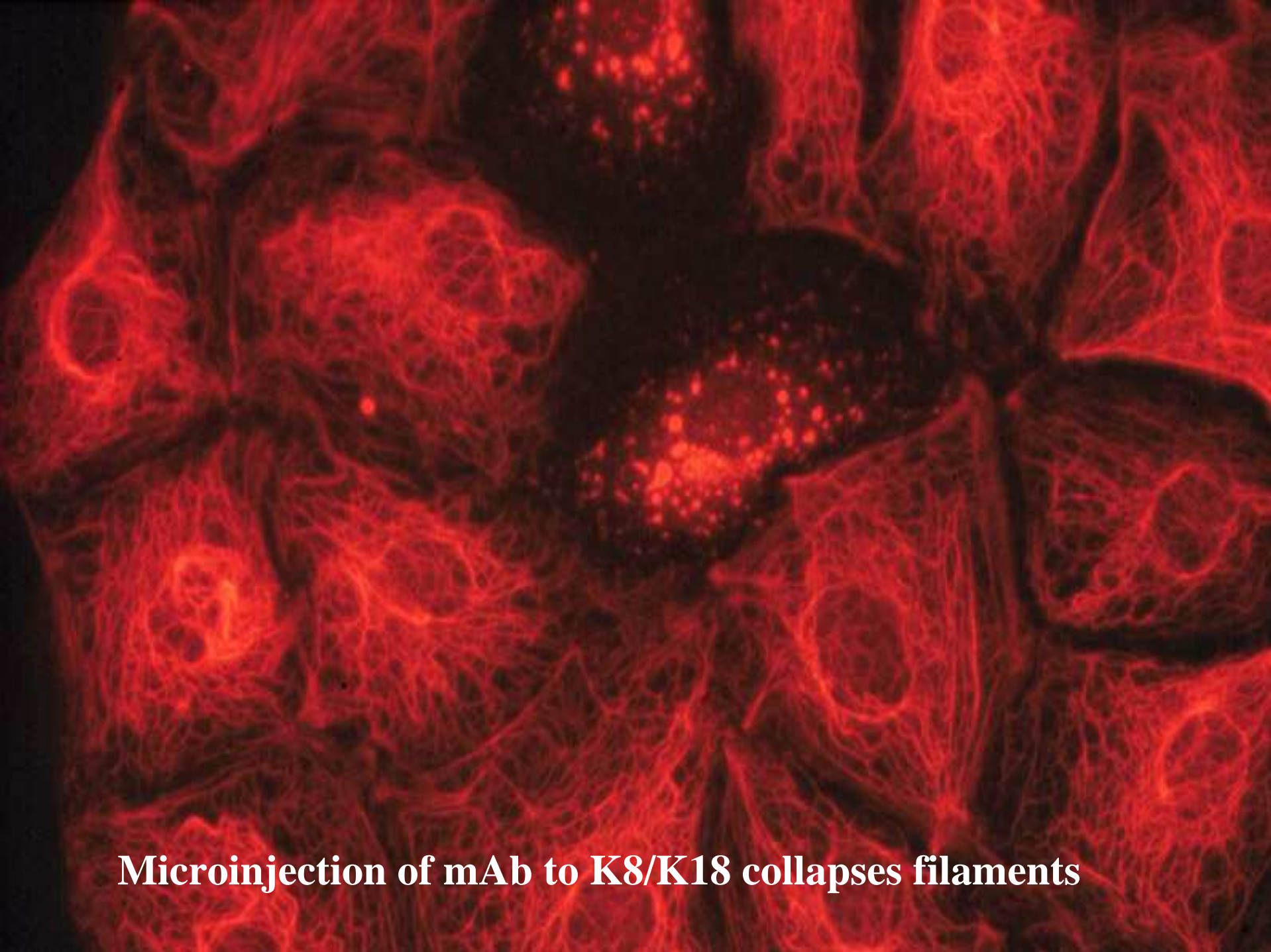


H1299 (-ve control)

H1299 + MDM2

Využití monoklonálních protilátek

- MAb jsou fantastickým nástrojem pro buněčnou a molekulární biologii
 - **Imunofluorescenční mikroskopie, imunoblotting, afinitní purifikace**
 - **inhibice ligandů/receptorů**

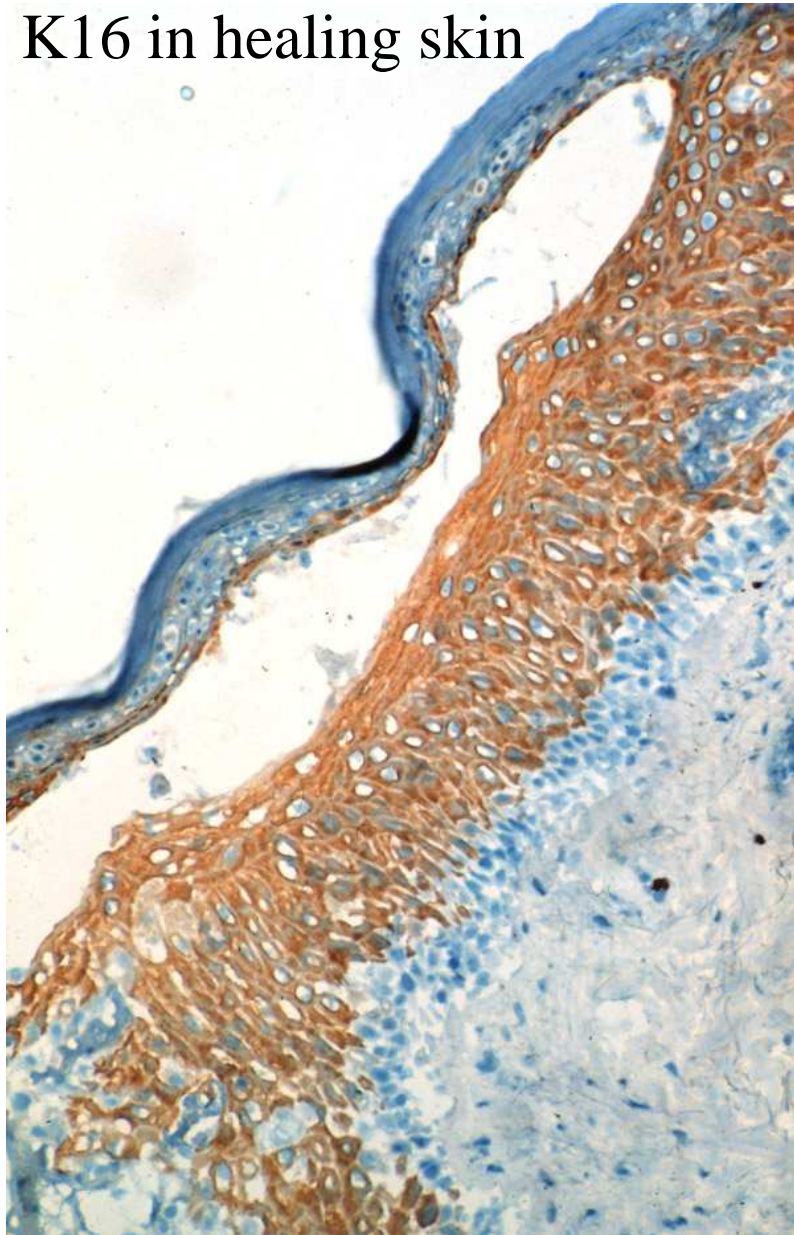


Microinjection of mAb to K8/K18 collapses filaments

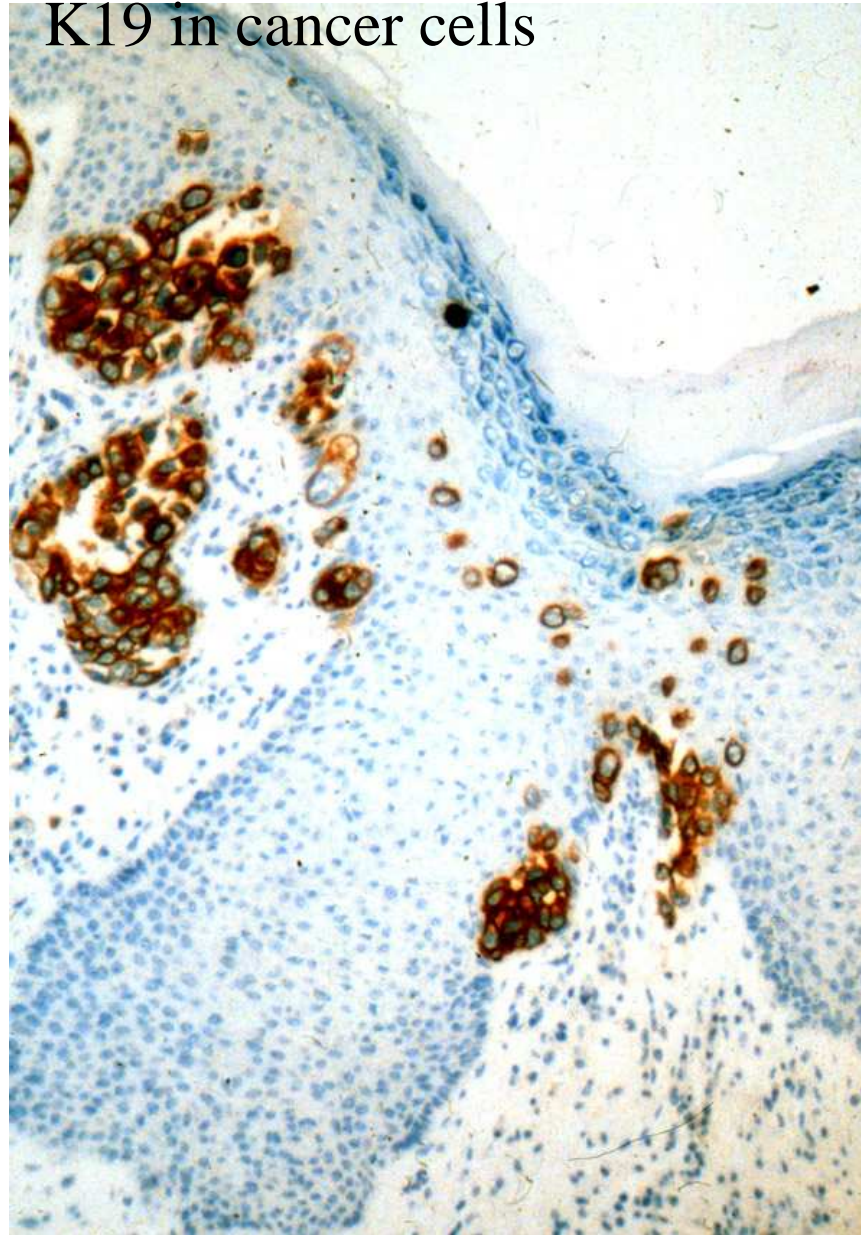
Využití monoklonálních protilátek

- Mab jsou jsou fantastickým nástrojem pro buněčnou a molekulární biologii
 - Immunofluorescence microscopy, immunoblotting, affinity purification
 - Inhibition of ligands/receptors
- Diagnostická patologie
 - histochemie

K16 in healing skin



K19 in cancer cells



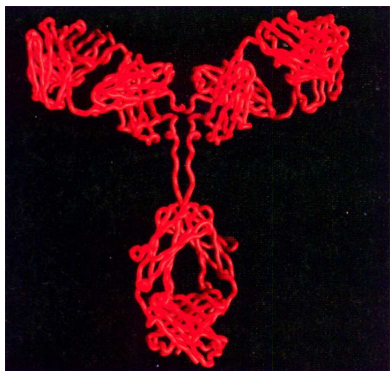
Využití monoklonálních protilátek

- Mab jsou jsou fantastickým nástrojem pro buněčnou a molekulární biologii
 - Immunofluorescence microscopy, immunoblotting, affinity purification
 - Inhibition of ligands/receptors
- Diagnostická patologie
 - Histochemie
- **Cílená terapie**

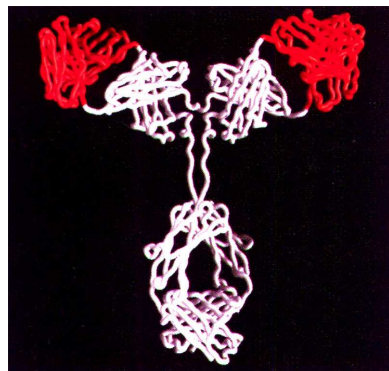
Monoklonální protilátky jako terapie - the “Magic Bullet”?



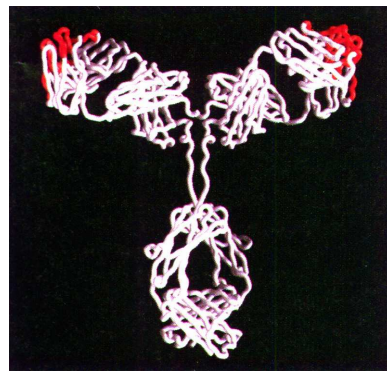
Humanizace myších monoklonálních protilátek



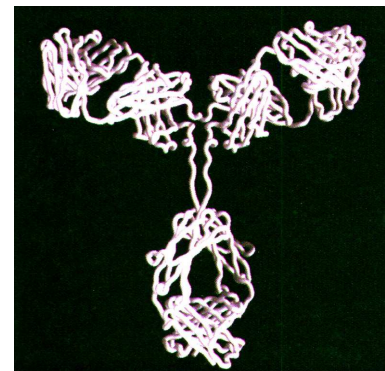
myší IgG



**Chimerické Ig:
již lidský těžký
řetězec**



**Humanizované Ig:
zůstala pouze myší
variabilní oblast**



Lidské IgG

Monoklonální protilátky schválené pro terapii

Orthoclone OKT3 (mouse)

Transplant rejection (1986)

Reopro (chimaeric)

Cardiovascular disease (1994)

Rituxan (chimaeric)

Non-Hodgkin's lymphoma (1997)

Zenapax (humanized)

Transplant rejection (1997)

Simulect (chimaeric)

Transplant rejection (1998)

Synagis (humanized)

Respiratory syncytial virus (1998)

Remicaide (chimaeric)

Rheumatoid arthritis/Crohn's disease

Herceptin (humanized)

Metastatic breast cancer (1998)

Mylotarg (humanized/toxin)

Acute myelogenous leukemia (2000)

Campath (humanized)

Chronic lymphocytic leukemia (2001)

Zevalin (chimaeric/radionuclide)

Non-Hodgkin's lymphoma (2002)

10 nejdůležitějších kroků při přípravě monoklonálních protilátek

- | | |
|-------------------------------------|--------------------|
| 1. Think | • 60 secs |
| 2. Design screen | • 1-5 days |
| 3. Raise antibodies in mouse | • 8 weeks |
| 4. Fuse cells | • 2 hours |
| 5. Grow hybrids | • 1-2 weeks |
| 6. Screen hybrids | • 1 day |
| 7. Clone viable cells | • 2-4 weeks |
| 8. Screen clones | • 1 day |
| 9. Characterise antibodies | • 1 year |
| 10. Publish | • 1-5 years |

Average total:

2 years 3 months

What is a good antigen for antibody generation? Can we use the cells or total protein lysates?

We could use anything for antibody generation.

The critical point is to have a very good screening method when we are using the cells, cell lysates, tagged proteins or peptides.

If we are using the cell lysates or cells the antibodies we are generating are against the major proteins in the lysate so sometimes it is better to use fractionated lysates.

Only very good screening can give you good antibodies.

The best for immunisation is purified protein without any tag sequence.

Using peptides needs careful thinking before immunization!!!

N-terminal peptide (we need free N-terminus)	EAESGSSTSQC
C-terminal peptide (we need free C-terminus)	SHGPMLVAELE
Peptide from middle of protein	DSDSSGADTF(C)
Free NH ₂ group and we need free C-terminus	CQIYGKPIYQG
Free NH ₂ groups and we need free N-terminus	SLLTKQSEKAC

**What to do if the mice show no response to the peptide or protein?
Can we combine different peptides to immunize them? How soon
shall we terminate and kill the animal if their serum is negative in
the assay.**

In my lab we combine different peptides if we are developing monoclonal antibodies. For polyclonal antibody development we combine only peptides from the same protein.

It is not usual that the animal will not respond to the peptide if the peptide is well designed and coupled to carrier.

Response to the protein could be weak or none.

If we have animals with negative sera after third injection of antigen (2 months after first injection of antigen) we terminate the animal and start a new immunization with a new set of mice and newly purified antigen or new set of peptides.

