

DAGMARA MIERZEJEWSKA, LUCJAN JĘDRYCHOWSKI

PRODUKCJA, CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIE PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH W ANALIZIE LABORATORYJNEJ

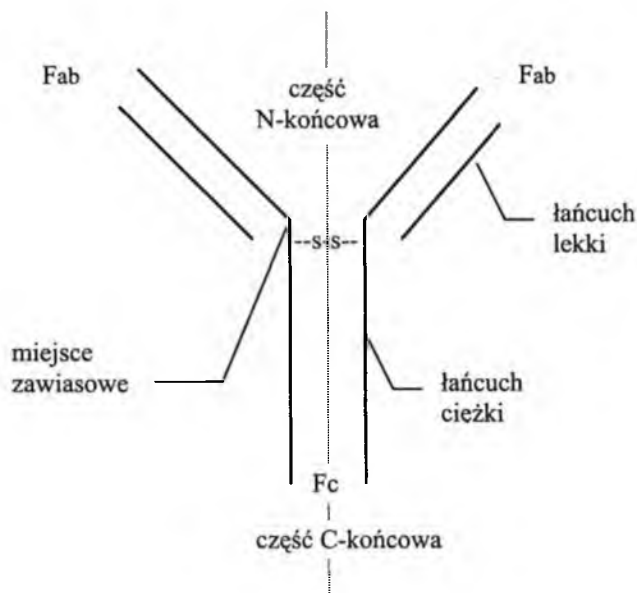
Streszczenie

Wyróżniamy dwa rodzaje przeciwciał: monoklonalne (Mab; mają zdolność swoistego rozpoznawania pojedynczego determinantu antygeny) i poliklonalne (charakteryzują się zdolnością reagowania z wieloma epitopami antygeny). Specyfika oddziaływań pomiędzy antygenem a przeciwciałem sprawia, że przeciwciała monoklonalne znajdują coraz szersze zastosowanie w analizie laboratoryjnej w medycynie, w badaniach żywności i in.

Produkcja przeciwciał monoklonalnych obejmuje szereg następujących po sobie etapów: 1-wybór antygeny, 2-wybór myszy i linii komórkowej, 3-immunizacja, 4-fuzja komórek i selekcja hybryd produkujących Mab skierowane swoiście do antygeny, 5-produkcję przeciwciał monoklonalnych *in vitro*, na dużą skalę, 6-oczyszczenie.

Wstęp

Przeciwciała są immunoglobulinami syntetyzowanymi przez układ immunologiczny po stymulacji antygenem. Wykazują aktywność swoiście skierowaną przeciwko temu antygenowi. Immunoglobuliny stanowią grupę pokrewnych białek charakteryzujących się określonymi cechami fizykochemicznymi i biologicznymi. Są wytwarzane przez komórki plazmatyczne i wydzielane do krwi lub płynów ustrojowych. Wyróżniamy pięć klas przeciwciał u człowieka: IgG (ilościowo najliczniej reprezentowana klasa w surowicy, ok.12g/l), IgA, IgM, IgD, IgE [4]. Przeciwciała posiadają dwa jednakowe fragmenty mogące wiązać antygen, tworząc z nim rozpuszczalny kompleks nie ulegający wytrąceniu. Te jednowartościowe fragmenty nazywane są Fab (ang. „*fragment antigen binding*”). Trzeci fragment nie posiada tej zdolności i nazywany jest Fc (ang. „*fragment crystalizable*”). Zaproponowany model budowy przeciwciała odpowiadający konfiguracji przestrzennej tych białek przedstawia rys. 1 [4, 8].



Rys. 1. Model budowy przeciwciała.

Fig. 1. Model of antibody structure.

Konfiguracja immunoglobulin przypomina kształt litery Y, której ramiona mogą rozwierać się do kąta 180° , dzięki obecności miejsca zawiasowego (ang. „*hinge region*”), wrażliwego na działanie pepsyny i papainy [4, 8].

F_{ab} i F_c zbudowane są z łańcuchów lekkiego i ciężkiego. Nazwy te przyjęto ze względu na ich wielkość, którą określono doświadczalnie podczas frakcjonowania na żelach [8].

Istnieją dwie teorie powstawania przeciwciał [8]:

Teoria instrukcji zakłada, że antygen działa jako informacja i jest matrycą na której standardowy, niepofałdowany łańcuch γ -globuliny jest modelowany tak, że uzyskuje wymagany kształt odpowiadający antygenowi. Częsteczka ta jest stabilizowana w tej konfiguracji przez mostki dwusiarczkowe, wodorowe i inne. Po oddzieleniu od matrycy cząsteczka zawiera miejsce swoiście wiążące się z antygenem.

Teoria selekcji zakłada, że informacja potrzebna do syntezy różnych przeciwciał jest obecna w aparacie genetycznym. Gen, który koduje swoiste przeciwciało jest wybierany przez kontakt antygeny z komórką i stymuluje syntezę odpowiednich łańcuchów peptydowych. Te z kolei ulegają spontanicznemu pofałdowaniu zależnemu od sekwencji aminokwasowej. Utworzona w ten sposób globularna konfiguracja posiada miejsce swoiście wiążące się z antygenem. Obie te teorie mają swoich zwolenników i przeciwników. Korzystając z różnorodnych technik analitycznych (autoradiografia, immunofluorescencja) próbuje się uzasadnić każdą z nich.

Immunizacja organizmu złożonymi antygenami, o wielu determinantach, powoduje wytwarzanie przeciwciał o różnej swoistości. Uzyskana w ten sposób surowica odpornościowa zawiera przeciwciała pochodzące od wielu różnych komórek plazmatycznych (jedna komórka plazmatyczna ma zdolność do produkcji tylko jednego typu przeciwciała). Surowicę tą określamy jako poliklonalną, a zawarte w niej przeciwciała nazywamy przeciwciałami poliklonalnymi.

Stosując odpowiednie technologie możemy uzyskać surowice zawierające wysoce specyficzne przeciwciała wiążące się z jednym epitopem, tzw. przeciwciała monoklonalne. Technologia produkcji przeciwciał monoklonalnych (Mab) jest dużo bardziej skomplikowana niż poliklonalnych. Zastosowanie Mab, jako narzędzia badawczego, pozwala uzyskać szereg dodatkowych informacji, najczęściej związanych z charakterystyką epitopu antygeny.

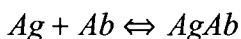
Przeciwciała monoklonalne mają zdolność swoistego rozpoznawania pojedynczego determinantu antygeny – epitopu. Sekwencja 5 lub 6 aminokwasów jest wystarczająca by go rozpoznać [2, 9]. Ta cecha przeciwciał monoklonalnych jest ich największą zaletą, gdyż podwyższa ich specyfikę oraz specyfikę oznaczeń, w których się je wykorzystuje.

Mab nie są jednak bez wad. Niektóre z nich ulegają reakcjom krzyżowym. Dlatego ważnym wyróżnikiem charakteru Mab jest ich powinowactwo do antygeny. Ze względu na tę cechę podzielono je na dwie grupy [1]:

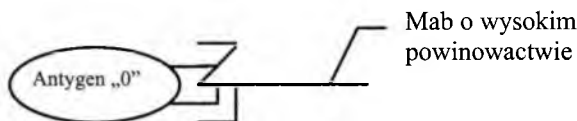
- przeciwciała monoklonalne o **wysokim powinowactwie** – epitop antygeny i przeciwciała doskonale do siebie pasują. Ten typ przeciwciał należy do grupy IgG i ma zdolność wiązania się z antygenem zawierającym nawet fragment epitopu antygeny przeciwno, któremu je wyprodukowano (rys. 2).
- przeciwciała monoklonalne o **niskim powinowactwie** – należą do klasy IgM, mają zdolność wiązania się z antygenami, których epitopy nie są podobne do epitopu antygeny, przeciwno któremu zostały skierowane (rys. 3).

Stosunek ilościowy obu tych typów Mabs w surowicy zależy ściśle od stężenia podawanego antygeny. Można przypuszczać, że kiedy odpowiednia liczba cząsteczek antygeny wiąże się z przeciwciałami receptorowymi na powierzchni komórki to limfocyt zostanie pobudzony dając klon produkujący przeciwciała. Jeśli obecna jest tylko mała ilość antygeny, wówczas jedynie limfocyty posiadające przeciwciała receptorowe o wysokim powinowactwie zdolne będą do wiązania wystarczającej ilości antygeny. Ich potomne komórki będą produkować również przeciwciała o **wysokim powinowactwie**.

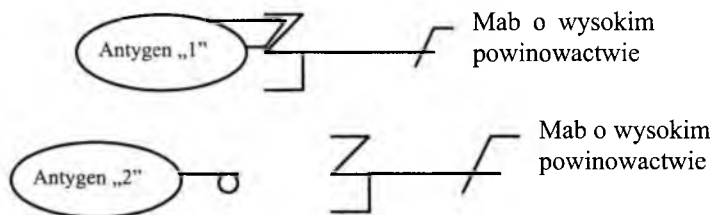
Według równania równowagi antygen (Ag) \leftrightarrow przeciwciała (Ab)



można sądzić, że gdy stężenie antygeny wzrasta, to nawet przeciwciała o względnie małym powinowactwie będą wiązać więcej antygeny. Dlatego przy wyższych stężeniach antygeny pobudzone będą również limfocyty z receptorami immunoglobulin o mniejszym powinowactwie. Takich limfocytów jest niestety dużo więcej, niż tych, z receptorami o wysokim powinowactwie.

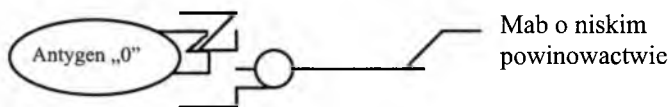


Reakcje krzyżowe Mab o wysokim powinowactwie, z dwoma niezależnymi antygenami mogą być schematycznie przedstawione w następujący sposób:

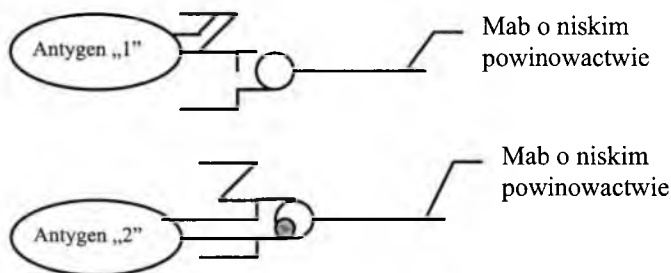


Rys. 2. Przeciwciała monoklonalne o wysokim powinowactwie.

Fig. 2. Monoclonal antibodies of high affinity.



W przypadku tych przeciwciał przebieg reakcji krzyżowych wygląda następująco:



Rys. 3. Przeciwciała monoklonalne o niskim powinowactwie.

Fig. 3. Monoclonal antibodies of low affinity.

Produkcja przeciwciał monoklonalnych

Przed przystąpieniem do właściwych prac związanych z procesem produkcji Mab należy wykonać szereg prac przygotowawczych: zapoznać się z obowiązującymi przepisami prawnymi dotyczącymi hodowli zwierząt i wykorzystywania ich do doświadczeń, zgromadzić odpowiedni sprzęt i wyposażenie laboratorium do hodowli, zapoznać się z metodyką prowadzenia hodowli zwierząt oraz prowadzenia hodowli tkankowych, rutynowych testów prowadzonych w trakcie produkcji, zasadami utrzymywania sterylności (w odniesieniu do szkła i laboratorium), zasadami dbania o swoje bezpieczeństwo itp., zapoznać się z biochemią badanego antygeny oraz fizjologią zwierząt doświadczalnych [1, 9].

Produkcja przeciwciał monoklonalnych zawiera następujące etapy (schemat 1) [1, 2, 3, 7, 9]:

a) wybór antygeny

Poziom odpowiedzi immunologicznej organizmu zależy od charakteru antygeny. Antygen o większej masie cząsteczkowej (powyżej 10 kDa), skomplikowanej budowie chemicznej i różniący się swym charakterem od białek zwierzęcia immunizowanego wywołuje silniejszą odpowiedź obronną organizmu niż mniejsze białka zwane haptunami, które wymagają wcześniejszej koniugacji z białkiem nośnikiem.

b) wybór myszy i linii komórkowej [7, 9]

Wybór myszy (lub szczura) do produkcji Mab jest zwykle ograniczony pochodzeniem linii szpiczaka. Wybraną linię komórkową szpiczaka P3X63-Ag8 wyhodowano na myszy o fenotypie Balb/C. Myszy o tym fenotypie mają stosunkowo duże śledziony, co jest dodatkowym argumentem popierającym ten wybór.

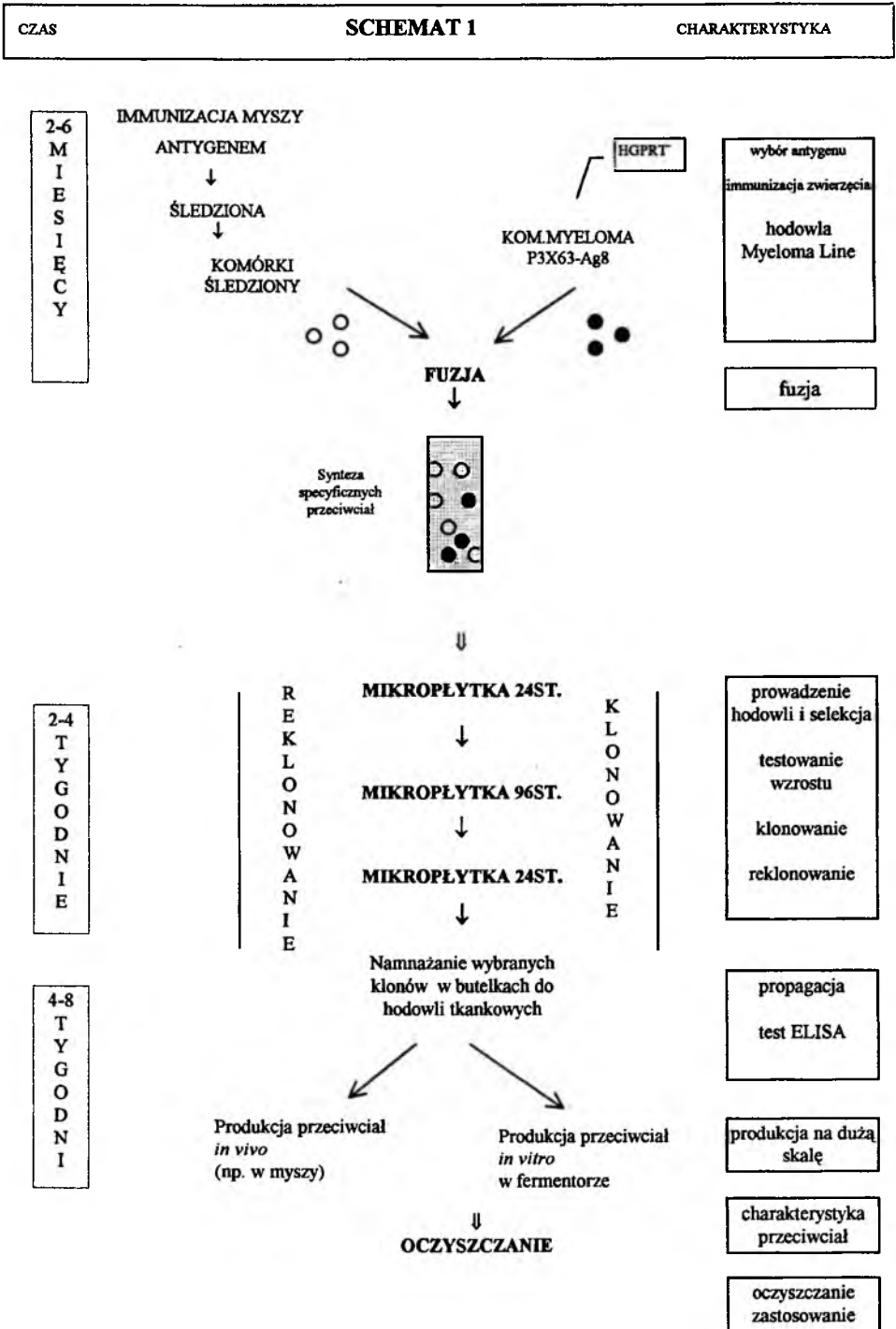
Plasmocytoma X63, linii szpiczaka P3X63-Ag8, produkuje pełną sekwencję IgG1. Komórki X63 poddawane fuzji mogą wzrastać przy niskiej gęstości komórek, co jest dużym ułatwieniem przy klonowaniu hybryd.

c) immunizacja

Immunizacja zwierzęcia odbywa się dwuetapowo według określonych protokołów: dawka wstępna (z reguły maksymalna ilość antygeny tzn. 100 µg/mysz) i kilkakrotne doszczepianie (10–50 µg/mysz) [7]. Przyjmuje się, że najlepszym miejscem immunizacji wstępnej jest jama otrzewnowa (wówczas antygen stymuluje działanie limfocytów śledziony).

Inne rodzaje szczepień to:

- podskórne – stymuluje działanie węzłów chłonnych,
- w łapkę – może powodować zapalenie i obrzmienie, co jest męczące dla zwierzęcia,



- śródskórne, domięśniowe – mogą zakończyć się owrzodzeniem zagrażającym życiu,
- bezpośrednio do śledziony – trudne do przeprowadzenia, może spowodować śmierć zwierzęcia,
- dożylnie – trudne do przeprowadzenia, może spowodować śmierć zwierzęcia, zalecane jedynie w szczególnych przypadkach podczas doszczepiania przed fuzją [7].

d) fuzja komórek i pasażowanie [1, 2, 9]

Zawiesina komórek śledziony (określona liczba komórek/ml medium) i szpiczaka poddawana jest fuzji i wysiewana na mikroplytkach o 96 studzienkach. W roztworze po fuzji znajdują się cztery rodzaje komórek:

- komórki szpiczaka, które nie uległy fuzji (kancerogeny),
- komórki śledziony, które nie uległy fuzji,
- nieprawidłowe komórki hybryd,
- hybrydy produkujące przeciwciała monoklonalne.

Głównym celem tego etapu badań jest wyselekcjonowanie z mieszaniny komórek populacji hybryd produkujących Mab, skierowanych swoiście przeciwko stosowanemu antygenowi.

Komórki szpiczaka charakteryzują się defektem enzymatycznym objawiającym się brakiem kinazy tymidyny (TK) lub hypoksantyno-guanino-fosforylo transferazy (HGPRT), co uniemożliwia im syntezę zasad purynowych, a w rezultacie syntezę DNA i RNA. Wysiew komórek na selektywne podłoże, np. z dodatkiem aminopteryny, powoduje ich śmierć. W tych warunkach giną również pozostałe komórki śledziony i źle utworzone hybrydy [7].

Hybrydy produkujące Mab, wykorzystując dużą żywotność komórek nowotworowych i zdolność syntezy RNA i DNA komórek śledziony, przeżywają. W ten sposób po ok. 2 tygodniach uzyskuje się względnie specyficzne klony produkujące przeciwciała monoklonalne. Specyficzność, wyprodukowanych przez hybrydy Mab, do antygeny sprawdzana jest testem ELISA. Wartość absorbancji jest miarą zarówno ilości jak i jakości wyprodukowanych przez poszczególne klony hybryd. Wybierając te o największym powinowactwie do antygeny pasażuje się je na płytkach 24 studzienkowych, a następnie w butelkach hodowlanych w celu zwiększenia skali hodowli.

Wzrost i jakość hybryd w całym procesie produkcyjnym kontrolowany jest metodą indirect i direct ELISA. Co pewien czas, w momencie maksymalnego wzrostu, zamraża się część hodowli tworząc w ten sposób bank komórek.

Produkcję w skali „makro” możemy prowadzić w specjalnych bioreaktorach typu „hallow fiber”. Przykładem takiego bioreaktora jest CELLMAX. Urządzenie to zawiera specjalne nośniki wiążące hybrydy na swojej powierzchni. Przeciwciała produkowane są w ciągłym przepływie medium, dzięki czemu można zminimalizować zużycie

surowicy krwi oraz uzyskać większe stężenie przeciwciał na jednostkę objętości niż tradycyjną metodą hodowli.

Uzyskanie supernatantu zawierającego Mab jest zazwyczaj etapem wystarczającym do zastosowania ich jako narzędzia badawczego. W zależności od późniejszego zastosowania Mab czasem zachodzi potrzeba zagęszczenia i oczyszczenia uzyskanego supernatantu (pozostałości FCS, czerwieni fenolowej). Ujednoliconą surowicą używaną jest do oznaczania wyjściowego antygeny.

Oczyszczanie przeciwciał monoklonalnych

W niektórych oznaczeniach substancje, jak np. białko surowicy krwi, dodawane w trakcie hodowli Mab mogłyby interferować z reagentami i fałszować wyniki. Dlatego czasem zachodzi konieczność oczyszczania przeciwciał. Zastosowanie Mab w medycynie klinicznej (ewentualny kontakt z człowiekiem) stawia dodatkowe wymagania względem ich czystości tzn. powinny one być wolne od toksyn, pyrogenów i antygenowych substancji [5, 9].

Przed wyborem techniki oczyszczania należy ustalić czy etap ten jest potrzebny, jeśli tak to w jakim stopniu powinien być oczyszczony produkt finalny. Przy wyznaczaniu kryteriów stopnia oczyszczania warto mieć na uwadze [3]:

- oszczędność czasu, zużycie pracy i materiałów w przypadku niepotrzebnego oczyszczania,
- uwzględnić metody, które pomimo że są mniej specyficzne i dają „gorszy” produkt niż inne, jednocześnie są szybsze, tańsze a produkt końcowy ma klasę czystości wystarczającą do prowadzonych analiz.

Ważnym elementem jest również źródło Mab tzn.[5]:

- Mab pochodzenia *in vivo*- produkowane przez hybrydy wzrastające w organizmie zwierzęcia. Uzyskane Mab zawieszane są w płynie owodniowym. Ich koncentracja wynosi 1-15mg/ml zawiesiny. Obok nich w płynie zawartych jest wiele innych białek żywiciela, lipidów i komórek obumarłych. Białka żywiciela stanowią problem, gdyż zawierają dużo albuminy, transferyny i immunoglobulin bardzo podobnych do przeciwciał monoklonalnych. Problem stanowią tu również enzymy proteolityczne, które mogą uszkodzić produkt finalny. W takim przypadku oczyszczanie jest procesem niezbędnym.
- Mab produkowane *in vitro* przez komórki hybryd hodowanych na odpowiednim podłożu w bioreaktorze. Mab zawieszane są w supernatancie. Ich stężenie jest dużo mniejsze niż w przypadku hodowli *in vivo* i zawiera się w granicach 0,01-0,5 mg/ml supernatantu. Głównym źródłem zanieczyszczeń jest woda. Obok przeciwciał supernatant zawiera znaczne ilości obcych białek (np. z FCS) i zanieczyszczeń

jak np. czerwień fenolowa (wskaźnik pH podłoża). Wskaźnik silnie adsorbuje się na podłożu chromatograficznym i nie wymaga specjalnych zabiegów usuwania.

- Mab pochodzenia *in vitro*- hodowane w specjalnych reaktorach „hollow fiber”. Dzięki takiej technice są one bardzo skoncentrowane, powyżej 10 mg/ml zawiesiny. Nie zawierają żadnych lipidów. Towarzyszące przeciwciałom zanieczyszczenia pochodzą jedynie z podłoża. Są to resztki białek FCS, czerwień fenolowa, albumina, transferyna, wołowe IgG i woda. Jakkolwiek są one obecne w dużo mniejszym stężeniu niż w dwóch powyższych przypadkach.

Oczyszczanie przeciwciał jest zazwyczaj procesem wieloetapowym i składa się z następujących etapów [2, 5, 9]:

a) przygotowanie próby

Etap ten ma na celu przygotowanie próby do dalszego oczyszczania wykorzystującego techniki chromatograficzne.

Obejmuje on:

- usunięcie, przez wysolenie, większych ilości białka pochodzenia źródłowego;
- usunięcie specyficznych zanieczyszczeń jak lipoproteiny, czerwień fenolowa;
- wymianę buforu.

Najpopularniejszym sposobem wysalania jest **wysalanie siarczanem amonowym**. W metodzie tej wykorzystywane jest selektywne wytrącanie różnych frakcji białek w próbce. Siarczan amonowy jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie, redukuje zawartość lipidów, stabilizuje większość białek w roztworze (niektóre Mab mogą ulec denaturacji). Jest doskonałym krokiem wstępnym przed zastosowaniem hydrofobowych interakcji chromatograficznych w dalszych etapach oczyszczania. Metoda ta pozwala na usunięcie 50% białek zanieczyszczających produkt.

Technika wysalania siarczanem amonowym jest etapem czasochłonnym i nie nadaje się do użycia w skali preparatywnej.

Klarowanie polega na usunięciu resztek nierozpuszczonych białek i substancji, które mogłyby zanieczyścić kolumny w dalszych etapach oczyszczania. Bardzo popularną metodą klarowania jest wytrącanie siarczanem dextranu lub poliwinylpirolidyną (PVP).

Wymiana buforu i odsalanie jest przydatne przy przygotowywaniu próby przed kolejnymi etapami oczyszczania chromatograficznego. W porównaniu z innymi metodami wymiany buforu (dializa) filtracja żelowa jest stosunkowo wygodna i łatwo ją przystosować do różnych warunków. Filtracja żelowa, np. przy użyciu żeli Sephadex służy głównie do oddzielania dużych molekuł białek (np. immunoglobuliny) od małych peptydów, soli i innych rozpuszczalnych składników pochodowlanych.

b) oczyszczanie główne

Etap ten jest najbardziej krytyczny i efektywny dla całego procesu oczyszczania. Uwzględnia się w nim specyfikę wyprodukowanych Mab i właściwości pozostałych zanieczyszczeń. Wybór sposobu przygotowania próby jest ściśle związany z tym etapem.

Zazwyczaj uwzględnia się następujące dane:

- właściwości Mab: ich rozmiar, ładunek, pI, stabilność, hydrofobowość, powinowactwo do nośników Protein A lub G, i innych,
- właściwości pozostałych po wysoleniu zanieczyszczeń,
- możliwość dostępu do odpowiedniego sprzętu i medium,
- dostęp do czystego antygenu,
- skala oczyszczenia,
- preferencje (możliwości i umiejętności) pracownika.

W zależności od tych elementów korzystamy z następujących metod chromatograficznych:

Chromatografia powinowactwa

Chromatografia powinowactwa polega na specyficznej i odwracalnej adsorpcji oczyszczanych białek przez substancję wiążącą (ligand), kowalencyjnie połączoną z nierozpuszczalną matrycą nośnika. Próba zawierająca przeciwciała monoklonalne jest nanoszona na kolumnę i w odpowiednich warunkach Mab wiążą się z ligandami. Niezwiązane związki są wymywane. Po zmianie buforów wymywających Mab (IgG) są uwalniane. W chromatografii powinowactwa najczęściej stosowanym złożem przy oczyszczaniu Mab pochodzenia *in vivo* jest Protein A.

Chromatografia jonowymienna

W chromatografii jonowymiennej wykorzystuje się różnice w ładunku elektrycznym molekuł. Składniki naniesionej na kolumnę próby wiążą się z fazą stałą podłoża kolumny z różną siłą. Zmieniając stężenie soli i pH eluentu regulowana jest siła wiązania do podłoża, powodując w ten sposób elucję różnych rodzajów białek w różnym czasie. Ten rodzaj chromatografii, zarówno aniono- jak i kationowymiennej, jest bardzo popularny przy oczyszczaniu Mab. Technika ta jest szczególnie przydatna przy rozdziale monoklonalnych IgG od IgG żywiciela (wynika to ze zróżnicowania ładunków tych białek). Jest to również doskonała technika do oczyszczania surowicy poliklonalnej. Zapewnia ona efektywną koncentrację przeciwciał w połączeniu z wysokim stopniem rozdziału.

Złoża stosowane na tym etapie to najczęściej:

- wymiennicze anionowe – Mono Q, Q Sepharose High Performance,
- wymiennicze kationowe – Mono S, SP Sepharose High Performance, Hydroxyapatite (forma fosforanu wapnia).

Mineralny wymiennicz kationowy jest ostatnio szeroko używany w biochemii mimo, że dotychczas nie są znane zasady mechanizmu absorpcji w chromatografii hydroxyapatytowej.

c) dalsze oczyszczanie [5]

Jeżeli poziom czystości produktu po pierwszych dwóch etapach jest niewystarczający nieodzowna jest jego dalsza obróbka. Na tym etapie korzysta się w dalszym ciągu z technik chromatograficznych: filtracji żelowej, HIC [hydrophobic interaction chromatography], – łatwa i efektywna metoda, i chromatografii jonowymiennej.

Filtracja żelowa

Rozdział molekuł uwarunkowany jest ich rozmiarem. Metoda ta używana jest najczęściej na zakończenie procesu rozdziału bądź jako metoda odsalania pomiędzy kolejnymi etapami oczyszczania.

Wymienionej techniki używa się do usunięcia zanieczyszczeń o zbliżonym ładunku do IgG Mab, zwykle częściowo usuniętych w pierwszym etapie przy użyciu kolumny jonowymiennej lub powinowactwa. Filtracja żelowa jest szczególnie przydatna do usuwania transferyny, którą trudno usunąć inną techniką. Filtracja żelowa doskonale sprawdza się przy usuwaniu dimerów, tetramerów i agregatów. Często używa się ją do odsalania lub wymiany buforu przed przechowywaniem finalnego produktu. Najczęściej stosowane złoża to: Sephadex G-25, PD-10, Sephacryl S-200 High resolution, Superdex 200.

Chromatografia wykorzystująca interakcje hydrofobowe (HIC)

Metodą chromatografii interakcji hydrofobowych rozdziela się biomolekuły wykorzystując różnice w ich hydrofobowości. Jest to technika alternatywna do pozostałych pod warunkiem, że Mab są stabilne przy wysokim stężeniu soli. Metodę HIC korzystnie można zastosować po wytrącaniu siarczanem amonowym, po którym próba zawiera duże stężenie soli. Technikę HIC można stosować pojedynczo lub w układzie szeregowym z filtracją żelową lub chromatografią jonowymienną. Metoda ta jest komplementarna do technik rozdziału opartych na rozmiarze lub ładunku biomolekuły.

Wszystkie IgG są hydrofobowe, chociaż istnieją wyjątki nawet wśród Mab z tej samej klasy. Ta cecha pozwala HIC w dużym stopniu usunąć IgG żywiciela. Najczęściej stosowane złoża to: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, Alkyl Superose.

Opisany trzystopniowy sposób oczyszczania przeciwciał jest typowy dla technologii oczyszczania przeciwciał monoklonalnych. Ilość etapów zależy jedynie od wymaganej klasy czystości produktu końcowego.

Zastosowanie

Wysoka specyficzność przeciwciał monoklonalnych w stosunku do antygeny, rozwój technologii produkcji Mab i eliminacja udziału zwierząt, spowodowały, że

zaczęły one konkurować z powszechnie stosowanymi do tej pory w analityce przeciwciałami poliklonalnymi.

Szczególnie szerokie zastosowanie znalazły one w diagnostyce immunologicznej i immunohistologicznej. Mab stosuje się w testach diagnozujących AIDS do badania proporcji komórek limfocytów pomocniczych T i T-supresorowych, co pomaga monitorować postęp tej choroby. Mają one ustalone miejsce w immunohistologicznym diagnozowaniu chorób rozrostu limfy i nowotworów [1, 7].

Nie bez znaczenie jest wykorzystanie technik immunometrycznych (z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych) w analizie żywności. Przydatne okazały się one w odróżnianiu gatunków mięsa w surowych, nieprzetworzonych produktach mięsnych. Mięso o podobnej pigmentacji, np. wołowina i konina, wołowina i baranina, mięso drobiowe i wieprzowe, są po zamrożeniu (szczególnie w dużej masie) wizualnie trudne do rozróżnienia. Wiele produktów mięsnych, jak kiełbasy, burgery, kotlety mielone są mieszaniną wielu gatunków mięs. To właśnie techniki immunometryczne stwarzają możliwość szybkiego oznaczenia zarówno jakościowego, jak i ilościowego składu poszczególnych produktów [6]. Techniki te pozwalają również z dużą dokładnością oznaczyć zawartość białek soi w produktach mięsnych. Kolejne przykłady zastosowania Mab w analizie żywności przedstawiają Morris B.A. i Clifford M.N. [6], np.:

- oznaczanie zafałszowań mleka krowiego mlekiem kozim i odwrotnie,
- oznaczanie denaturacji białek mleka (Białka mleka wywołują alergie u niemowląt i dzieci. Istnieje teza, że obróbka cieplna redukuje właściwości immunogenne tych białek. Metody immunometryczne pozwalają dokładnie określić poziom immunoreaktywnych białek w mleku przed i po obróbce, co pozwala *in vitro* określić wpływ poszczególnych procesów na immunoreaktywne właściwości białek mleka.),
- oznaczanie amyloglukozydazy w piwie,
- oznaczanie ochratoksyn w żywności (Ochratoksyny są toksycznym produktem metabolizmu niektórych grzybów, jak np. *aspergillus*, występujących jako naturalne zanieczyszczenie artykułów rolnych, syntetyzowanym podczas np. nieprawidłowego przechowywania. Ochratoksyny znajdują się w kukurydzy, owsie, pszenicy, jęczmieniu, orzechach, produktach wytworzonych na bazie ziaren np. pasze.),
- oznaczanie zanieczyszczeń i dodatków do żywności (bardzo istotne w kontrolowaniu jakości żywności).

Powyższe przykłady wykorzystania metod immunometrycznych w analizie żywności to jedynie kilka powszechnie stosowanych w laboratoriach analitycznych. Fakt rozwoju technik produkcji przeciwciał monoklonalnych tzn. otrzymywanie coraz bardziej wyspecjalizowanych fragmentów łączących się ze ściśle określonym epitopem, pozwala na coraz szersze stosowanie tych metod ze względu na zwiększenie ich precyzyjności i dokładności, oraz oznaczania coraz to większej liczby antygenów w żywno-

ści. Powoduje to również wzrost dostępnych na rynku gotowych, precyzyjnych testów immunometrycznych oferowanych przez firmy handlowe (np. SIGMA – ALDRICH: E.coli O157 TECRA[®], Aflatoxin M1, Aflatoxin B1, Progesterone i inne).

Słownik terminów immunologicznych

Antygen – substancja charakteryzująca się a) immunogennością czyli zdolnością do wywoływania odpowiedzi immunologicznej organizmu, b) antygennością czyli zdolnością do łączenia się z immunoglobulinami.

Determinanty antygenowe – obszary molekularne antygeny, które wiążą się ze swoistym przeciwciałem.

Epitop – determinant antygenowy o znanej strukturze.

Hapten – substancja o niskim ciężarze molekularnym, samodzielnie nie wykazująca właściwości immunogennych; po połączeniu z nośnikiem zyskuje cechy antygeny.

Immunogen – substancja obca dla organizmu wywołująca jego reakcję obronną, w której uczestniczą limfocyty i wytworzone przeciwciała.

Przeciwciała – białka z grupy immunoglobulin wytwarzane przez organizm uczestniczące w czynnościach odpornościowych organizmu; w zależności od budowy ciężkich łańcuchów wyróżnia się pięć klas immunoglobulin IgA, IgG, IgM, IgD, IgE.

Przeciwciała monoklonalne – przeciwciała otrzymane z pojedynczego klonu limfocytu, wyprodukowane w wyniku fuzji komórek śledziony immunizowanej antygenem myszy z komórkami szpiczaka.

Przeciwciała poliklonalne – przeciwciała wyprodukowane przez limfocyty na skutek immunizacji zwierzęcia antygenem.

LITERATURA

- [1] Campbell A.M.: Monoclonal antibody and immunosensor technology, Elsevier Science Publishers B.V., 1991.
- [2] Harlow E., Lane D.: Antibodies. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- [3] Liddell J.E., Cryer A.: Monoclonal antibodies, John Wiley & Sons Ltd., 1991.
- [4] Mackiewicz St.: MM Immunologia, PZWL, Warszawa, 1986.
- [5] Monoclonal antibody purification, Handbook – including Mab Assistant, Pharmacia, 1986.
- [6] Morris B.A., Clifford M.N.: Immunoassays in Food Analysis, Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1985.
- [7] Peters J.H., Baumgarten H.: Monoclonal antibodies, Springer – Verlag, 1988.
- [8] Roitt I.M.: Podstawy immunologii, PWN, Warszawa, 1977.
- [9] Tijssen P.: Practice and theory of enzyme immunoassays in laboratory techniques in Biochemistry and molecular biology, Elsevier Science Publishers B.V., 1985.

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN LABORATORY ANALYSIS

S u m m a r y

There are two kinds of antibodies employed in food analysis: **monoclonal antibodies** (Mab) characterized by unique specificity and an extremely high selectivity for the epitope, and **polyclonal antibodies** characterized by different specificity and affinity. Due to their specificity monoclonal antibodies are good analytical tools and more frequently employed in medicine or food analysis.

Production of monoclonal antibodies is carried out during the following stages: 1) antigen selection, 2) mouse and cell line selection, 3) cell fusion, 4) culture and hybridoma selection, 5) Mabs production bulk, 6) purification. ❖