

Received: 2015.08.12
Accepted: 2016.02.05
Published: 2016.04.27

Rozwój metod otrzymywania komórek wytwarzających przeciwciała monoklonalne

The development of methods for obtaining monoclonal antibody-producing cells

Michał Skowicki^{1,2*}, Tomasz Lipiński^{1,2**}

¹Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

²Wrocławskie Centrum Badań EIT+

Streszczenie

Przeciwciała monoklonalne są biomolekułami o dużym znaczeniu naukowym i praktycznym. Tworzą zbiór przeciwciał o jednakowej swoistości i sile wiązania ponieważ są syntezowane przez komórki hybridoma tworzące klon, czyli linię komórek wywodzących się od pojedynczej komórki. Po raz pierwszy metodę tworzenia mysich hybridom wytwarzających przeciwciała opisano w 1975 r., za co odkrywcy otrzymali Nagrodę Nobla. Obecnie są powszechnie wykorzystywane jako narzędzia badawcze w diagnostyce i coraz częściej w medycynie, zwłaszcza w transplantologii i terapii nowotworów. Obecnie dostępnych jest w Europie i Stanach Zjednoczonych ponad 47 preparatów terapeutycznych opartych na przeciwciałach monoklonalnych, a ich liczba rośnie z roku na rok. Proces otrzymywania komórek hybridomalnych jest wieloetapowy i czasochłonny. W związku z dużym zapotrzebowaniem na przeciwciała monoklonalne stale pracuje się nad ulepszeniem procesu ich otrzymywania, w celu m.in. jego skrócenia, zmniejszenia kosztów oraz liczby zwierząt laboratoryjnych. W artykule omówiono stosowane techniki w głównych etapach procesu i osiągnięcia związane z jego doskonaleniem i optymalizacją.

Słowa kluczowe:

przeciwciała monoklonalne • hybridoma • fuzja komórek • selekcja klonów

Summary

Monoclonal antibodies (mAbs) are biomolecules of great scientific and practical significance. In contrast to polyclonal antibodies from immune sera, they are homogeneous and monospecific, since they are produced by hybridoma cells representing a clone arising from a single cell. The successful technology was described for the first time in 1975; the inventors were later awarded the Nobel Prize. Currently, mAbs are broadly used as a research tool, in diagnostics and medicine in particular for the treatment of cancer or in transplantology.

*Publikacja współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

** Publikacja współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego oraz środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu NanoMat - „Wykorzystanie nanotechnologii w nowoczesnych materiałach”, (POIG.01.01.02-02-002/08) współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).



Key words:	About 47 therapeutics based on monoclonal antibodies are now available in the US and Europe, and the number is still growing. Production of monoclonal antibodies is a multistage, time-consuming and costly process. Growing demand for these molecules creates space for research focused on improvements in hybridoma technology. Lower costs, human labor, and time are important goals of these attempts. In this article, a brief review of current methods and their advances is given. monoclonal antibodies • hybridoma • cell fusion • clone selection
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1200552
Word count:	5648
Tables:	2
Figures:	3
References:	60

Adres autora: mgr Michał Skowicki, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; email: michal.skowicki@eitplus.pl

Wykaz skrótów: **BSA** – surowicza albumina wołowa (bovine serum albumin); **FBS** – płodowa surowica bydlęca (foetal bovine serum); **FCS** – płodowa surowica cielęca (foetal calf serum); **KLH** - hemocyjanina (keyhole limpet hemocyanin); **mAb** – przeciwciało monoklonalne (monoclonal antibody); **MBS** – m-maleimidobenzoylo N-hydroksysukcynimid (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide); **PEG** – glikol polietylenowy (polyethylene glycol); **SDS** – siarczan dodecyłu sodu (sodium dodecyl sulfate); **SRBC** – owcze czerwone krwinki (sheep red blood cells); **TT** – toksoid tężcowy (tetanus toxoid); **VSV** – wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (vesicular stomatitis virus).

WSTĘP

Przeciwciała to białka pełniące bardzo ważną rolę w układzie odpornościowym człowieka i innych kręgowców. Wytwarzane są przez komórki plazmatyczne wywodzące się z dojrzałych limfocytów B i są głównym elementem swoistej odpowiedzi odpornościowej. Ich zasadniczą funkcją jest rozpoznawanie i wiązanie „obcych” cząsteczek (antygenów), przede wszystkim znajdujących się na powierzchni wirusów, bakterii, pasożytów oraz antygenów wolnych, np. wydzielanych przez mikroorganizmy toksyn. Swoistość reakcji między antygenem i przeciwciałem jest zdeterminowana sekwencją fragmentów łańcuchów polipeptydowych tworzących miejsce wiążące określony antygen.

Szczegóły dotyczące budowy i funkcjonowania przeciwciał są dokładnie opisane w wielu pracach przeglądowych i podręcznikach [3,25] i nie będą omawiane w tym artykule, którego celem jest przegląd technik usprawniających proces otrzymywania przeciwciał monoklonalnych.

Zbiór przeciwciał o jednakowej swoistości i powinowactwie względem danego antygeny określa się mianem przeciwciał monoklonalnych. Wynika to z tego, że są wytwa-

rzane przez komórki stanowiące klon, czyli wywodzące się od pojedynczej komórki, a zatem syntezujących łańcuchy polipeptydowe przeciwciał o identycznej sekwencji. Jednakowa swoistość, siła wiązania z antygenem i homogeniczność cząsteczek przeciwciał monoklonalnych są ich wyróżnikami w stosunku do przeciwciał poliklonalnych uzyskiwanych z surowic odpornościowych. Cechy takie są szczególnie pożądane w niektórych aplikacjach np. diagnostyce czy w terapii, gdzie wymagana jest duża powtarzalność, niezawodność i zgodność ze specyfikacją.

Podstawowe różnice między przeciwciałami mono- i poliklonalnymi zestawiono niżej:

przeciwciała poliklonalne

- tanie i szybkie w przygotowaniu i produkcji,
- nie wymagają skomplikowanych technologii czy umiejętności,
- rozpoznają wiele epitopów w obrębie cząsteczki,
- duża siła wiązania,
- większa tolerancja na zmiany w konformacji epitopu,
- często dają silniejsze sygnały w technikach immunochemicznych,
- niepowtarzalność serii produkcyjnych,

- duża ilość przeciwciał niespecyficznych, możliwe większe tło,
- niezdatne do niektórych badań np. mapowanie epitopowe.

przeciwciała monoklonalne

- kosztowny i długotrwały proces produkcyjny,
- wymagane wysokie kwalifikacje personelu,
- preparaty są homogeniczne pod względem aktywności i właściwości biochemicznych, wiążą jeden epitop w obrębie antygeny,
- duża powtarzalność serii produkcyjnych,
- powtarzalność badań i eksperymentów,
- mniejsze tło w technikach immunochemicznych,
- są preferowane w aplikacjach, takich jak np. chromatografia immunopowinowactwa, mapowanie epitopowe i inne,
- wrażliwe na zmiany w strukturze epitopu.

Przeciwciała monoklonalne dzięki właściwościom są szczególnie użyteczne jako narzędzie badawcze (np. chromatografia powinowactwa), przede wszystkim w medycynie m.in. w badaniach diagnostycznych, terapiach przeciwnowotworowych, jako immunosupresory w transplantologii i stanach zapalnych lub w angioplastyce, jako czynnik zapobiegający krzepnięciu krwi. Innym ważnym zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych jest neutralizacja toksyn. Przeciwciała monoklonalne po raz pierwszy dopuszczono do zastosowań klinicznych w 1986 r. Mysie przeciwciało muromonab-CD3, występujące pod komercyjną nazwą Orthoclone OKT3, początkowo stosowano przy przeszczepach nerek, do dziś jest wykorzystywane w transplantologii [53]. Od 1986 r. do 2014 r. ponad 47 produktów opartych na przeciwciałach monoklonalnych zostało dopuszczonych do stosowania w Stanach Zjednoczonych i Europie. W 2013 r. globalne dochody ze sprzedaży wyniosły prawie 75 mld dolarów, co stanowiło prawie połowę całkowitej sprzedaży produktów biofarmaceutycznych. Szacuje się, że do 2020 r. na rynku dostępnych będzie około 70 preparatów przeciwciał monoklonalnych, a ich sprzedaż osiągnie około 125 mld dolarów na rok [22]. Duże zapotrzebowanie i szerokie zastosowanie przeciwciał monoklonalnych stymulują stały rozwój metod ich szybkiego otrzymywania. Po raz pierwszy sposób uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych opisali Kohler i Milstein w 1975 r., za co w 1984 r. otrzymali Nagrodę Nobla [35]. Zaproponowana przez nich metoda polega na unieśmiertelnieniu limfocytów B przez ich fuzję z komórkami szpiczaka. Dzięki temu zabiegowi można otrzymać stabilne linie komórek hybrydomalnych wytwarzających przeciwciała i dzielących się nieograniczoną ilość razy. Na proces otrzymywania przeciwciał monoklonalnych składa się kilka zasadniczych etapów: immunizacja, fuzja komórek B z komórkami szpiczaka, selekcja klonów wytwarzających pożądane przeciwciała oraz ich propagacja. Cały proces, od immunizacji do oczyszczenia przeciwciał, zajmuje około 4 miesiące. Ze względu na stale rosnące zapotrzebowanie na przeciwciała monoklonalne, istnieje konieczność doskonalenia procedur ich otrzymywania

pozwalających na skrócenie niezbędnego czasu i obniżenie kosztów materiałów i pracy personelu.

W artykule omówiono podstawowe techniki i kierunki ich optymalizacji na podstawowych etapach procesu.

Immunizacja

Pierwszym etapem w procesie uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych jest immunizacja. Indukuje ona w organizmie powstawanie i dojrzewanie dużej liczby limfocytów B, wytwarzających przeciwciała rozpoznające podany antygen. Jest najczęściej podawany z adiuwantem w celu skutecznego pobudzenia układu odpornościowego. Niezbędna ilość antygeny konieczna do uzyskania pożądanego przeciwciała jest różna dla różnych antygenów i organizmów zwierzęcych. Najczęściej wykorzystywanym modelowym zwierzęciem do otrzymywania przeciwciał monoklonalnych jest mysz szczepu Balb/c. Linie mysiego szpiczaka genetycznie zgodne z myszą szczepu Balb/c, uzyskane jako pierwsze, są obecnie bardzo dobrze poznane i szeroko stosowane. Hybrydomy z nich uzyskiwane cechują się dobrą stabilnością i produktywnością. Ponadto istotnym czynnikiem jest niski, w porównaniu do innych modeli, koszt utrzymania i pracy z myszami. Istnieją również stabilne linie szpiczaka kompatybilne z komórkami B innych gatunków zwierząt, jak np. szczura [34] lub królika [54]. Możliwa jest także fuzja ludzkich limfocytów, pozyskanych z węzłów chłonnych lub krwi obwodowej, ze stabilną linią szpiczaka ludzkiego [32].

Zgodnie z powszechnie przyjętym protokołem immunizacji myszy, zwierzętom podaje się podskórnie lub do otrzewnowo 1-2 iniekcje, zawierające 10-50 µg antygeny podanego w postaci emulsji z adiuwantem Freund'a lub innym adiuwantem, w odstępach 2-4 tygodni. Trzy dni przed fuzją stosuje się dodatkową immunizację, w której podaje się 50-500 µg antygeny dożylnie lub do otrzewnowo [24]. Do szczepienia, poza oczyszczonymi cząsteczkami, można wykorzystać także organelle, fragmenty błon komórkowych, a nawet całe komórki. Wydłużenie procesu immunizacji sprzyja zwiększeniu miana swoistych przeciwciał w surowicy, co koreluje z liczbą komórek B rozpoznających antygen, a także zwiększeniu swoistości i siły wiązania przeciwciał. Przelączenie klas i wzrost siły wiązania (affinity) wytwarzanych przeciwciał następuje również w miarę upływu czasu i kolejnych immunizacji. Stosując powszechnie przyjęte schematy immunizacji najczęściej uzyskuje się hybrydomy wytwarzające przeciwciała klasy IgG [29,38]. Klasa uzyskiwanych przeciwciał zależy również od natury antygeny; antygeny typu II (grasiczozależne) stymulują przede wszystkim powstawanie przeciwciał klasy IgG, a także IgA czy IgE, natomiast antygeny typu I (grasiczozależne) przeciwciał klasy IgM. Jak już wspomniano, antygenami używanymi do immunizacji mogą być preparaty oczyszczonych antygenów, mieszaniny antygenów, całe komórki lub inne duże struktury, takie jak np. preparaty błony komórkowej. Im bardziej oczyszczony jest antygen, tym większy procent komórek B będzie wytwarzał przeciwciała o oczekiwanej

swoistości. Należy jednak pamiętać, iż nie wszystkie antygeny w postaci oczyszczonej są w stanie wywołać odpowiedź odpornościową. Substancje takie nazywane są haptenami, a otrzymanie swoistych dla nich przeciwciał jest możliwe po sprzęgnięciu z tzw. cząsteczkami nośnikowymi zapewniającymi uzyskanie pełnej odpowiedzi odpornościowej.

Przykładem cząsteczek haptenowych są peptydy. Zwykle nie udaje się uzyskać odpowiedniej odpowiedzi odpornościowej po zaszczepieniu peptydem, nawet z zastosowaniem silnych adiuwantów. Immunizacja zwierząt za pomocą koniugatów peptydów z białkami lub nośnikami nanocząsteczkowymi pozwala na otrzymanie bardzo swoistej odpowiedzi odpornościowej i procentowo większy udział splenocytów wytwarzających przeciwciała skierowane przeciwko peptydowi. Najczęściej stosuje się jako nośniki duże, silnie immunogenne białka (TT, KLH, BSA), liposomy, nanocząstki metali szlachetnych, takie jak nanocząstki złota [40] czy srebra [23] lub nanocząstki krzemionkowe [31]. Dużym zainteresowaniem cieszą się nanocząstki złota dzięki łatwości otrzymywania i funkcjonalizacji powierzchni oraz małej toksyczności. Inną ich istotną zaletą jest brak właściwości antygenowych, dzięki czemu nie uzyskuje się przeciwciał skierowanych przeciwko nośnikowi. Stwierdzono, że duża immunogenność antygenów związanych z nanocząstkami złota wynika m.in. z ich wydajnej fagocytozy przez główne komórki zaangażowane w odpowiedź odpornościową – komórki dendrytyczne i fagocytarne monocyty [37].

Nanocząstki złota jako nośnik wykorzystano np. do indukcji odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko peptydowi stanowiącemu fragment białka wirusa pryszczycy. Myszy szczepu Balb/c były immunizowane peptydem immobilizowanym na nanocząstkach złota o różnej średnicy [14]. Immobilizacja do powierzchni nanocząstek złota została przeprowadzona przez C-terminalną cysteinę. W wyniku immunizacji uzyskano wysokie miana przeciwciał rozpoznających przyłączony peptyd, przekraczające 3-krotnie wartości uzyskiwane po szczepieniu koniugatami, w których nośnikiem było KLH (keyhole limpet hemocyanin) [14].

W razie konieczności uzyskania przeciwciał na antygeny, które sprawiają trudności w oczyszczeniu istnieje również możliwość immunizacji zwierzęcia fragmentem żelu poliakrylamidowego zawierającym rozdzielone białko [9]. Żel po rozdziale elektroforetycznym można zabarwić czernią amidową lub Coomassie blue, wyciąć pożądany prążek, odbarwić i następnie użyć do immunizacji z odpowiednim adiuwantem. W eksperymencie, w którym króliki immunizowano przygotowanymi w taki sposób preparatami kolagenazy i hipoderminy A, uzyskano przeciwciała na obydwa antygeny, niezależnie od sposobu barwienia i obecności lub braku SDS-u. Taka technika pozwala na skuteczną immunizację, nawet wtedy, gdy do dyspozycji pozostaje nieznaczna ilość nawet słabo oczyszczonych preparatów białek [9].

Interesującym podejściem pozwalającym na zmniejszenie liczby zwierząt laboratoryjnych podczas wytwarzania przeciwciał na dużą skalę jest tzw. immunizacja wieloantygenuowa (Multiplex). Polega na wstrzyknięciu immunizowanemu zwierzęciu więcej niż jednego antygeny podczas jednej immunizacji. Prócz zmniejszenia liczby niezbędnych zwierząt uzyskuje się również oszczędność materiałów i odczynników ponieważ klonowaniu podlegają jednocześnie hybrydomy wytwarzające przeciwciała rozpoznające wiele antygenów. Prace opisujące zastosowanie tej metody potwierdzają jej skuteczność. Wykonano eksperyment, w którym 8 myszy poddano immunizacji zestawem 10 antygenów (innym dla każdej myszy). Poza pierwszą immunizacją zastosowano tylko immunizację boost przed fuzją, aby uniknąć zjawiska dysproporcji w odpowiedzi odpornościowej na podane antygeny. Uzyskano hybrydomy wytwarzające przeciwciała na 67 z 80 podanych antygenów, co oznacza wydajność równą 83% [20]. W innym eksperymencie myszom podano po 5 różnych antygenów, po czym przeprowadzono fuzję wyizolowanych z nich splenocytów z komórkami szpiczaka. W wyniku pierwszej selekcji otrzymano średnio po 18 klonów hybrydom na każdy z podanych antygenów [20]. Badania wskazują jednak, iż im więcej antygenów zostanie zastosowanych do immunizacji jednej myszy, tym mniejsza będzie różnorodność klonów hybrydom, wytwarzających przeciwciała na każdy z tych antygenów. Technika ta nie jest zatem wskazana, gdy celem jest uzyskanie szerokiego panelu przeciwciał na dany antygen, skierowanych przeciwko różnym jego epitopom [15].

Powodzenie w wprowadzeniu linii hybrydom wytwarzających pożądane przeciwciała zależy w dużym stopniu od doboru właściwego schematu immunizacji. Czynniki, które należy uwzględnić przed immunizacją to: stężenie i ilość antygeny, który zostanie podany zwierzętom, wybór adiuwantu, sposobu szczepienia, liczba immunizacji oraz długości odstępów czasowych między immunizacjami, a także dobór odpowiednich metod analitycznych do identyfikacji produktywnych kolonii hybrydoma.

Innym sposobem immunizacji, który zaczyna być coraz szerzej stosowany jest immunizacja genetyczna. Polega na wprowadzeniu do organizmu zwierzęcia DNA kodującego określone antygeny. Ekspresja wprowadzonego materiału genetycznego skutkuje wytworzeniem obcego antygeny, który stymuluje odpowiedź odpornościową. Technika ta pozwala m.in. na otrzymanie przeciwciał dla białek, których nie można uzyskać w stanie natywnym lub w wystarczającej czystości. Synteza białek zachodzi *in vivo* i dzięki temu zachowują naturalną strukturę trzyczłonową oraz – w przypadku białek zwierzęcych – mają odpowiednie modyfikacje posttranslacyjne. Tak uzyskane przeciwciała są skierowane przeciwko natywnemu białku. Wektory ekspresyjne są dostarczane do komórek zwierzęcia przez działo genowe lub iniekcję domięśniową [15]. DNA jest w miarę stabilną cząsteczką i może zostać zaprojektowane tak, by kodowało więcej niż jeden antygen lub epitop. Podstawową zaletą tej metody jest ograniczenie liczby immunizacji. Jeżeli DNA zostaje podany bezpośrednio do

śledzony, wystarczy wówczas tylko jedna immunizacja [33]. Natomiast jeśli DNA jest wprowadzany domięśniowo potrzebne są jedna [7] lub dwie [18,19] immunizacje. Przykładem skutecznego zastosowania tej metody jest uzyskanie hybrydom wytwarzających przeciwciała przeciwko białku (18 kDa) z *Brucella abortus* [58].

Techniki fuzji

W wyniku fuzji błon komórkowych między komórkami szpiczaka i splenocytów dochodzi do powstania heterokarionów, zawierających dwa lub czasem więcej jąder komórkowych. Podczas kolejnego podziału dochodzi do fuzji jąder komórkowych, czego wynikiem jest powstanie komórki hybrydomalnej. W celu łatwego pozbycia się komórek szpiczaka, które nie uległy fuzji ze splenocytami, stosuje się linie pozbawione enzymu ważnego dla podtrzymania życia. Jedynie fuzja ze splenocytami umożliwia odzyskanie możliwości jego syntezy. W przypadku stosowanej powszechnie linii szpiczaka mysiego SP2/0, komórki pozbawione są fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HGPRT) – enzymu zaangażowanego w syntezę puryn. Dodanie do pożywki aminopteryny powoduje zablokowanie syntezy puryn drogą alternatywną i śmierć komórek szpiczaka, które nie uległy fuzji [30]. Obecnie stosuje się kilka metod pozwalających na dokonanie fuzji komórek, są to techniki chemiczne (glikol polietylenowy), elektryczne (elektrofuzja) i biologiczne (wirus Sendai, VSV).

Wirusy

Metoda fuzji komórek z wykorzystaniem wirusa Sendai została po raz pierwszy przedstawiona w 1960 r. [46]. Metodą tą posłużyli się także Kohler i Milstein prezentując po raz pierwszy uzyskanie przeciwciał monoklonalnych w 1975 r. [35]. Wirus Sendai ma w swojej strukturze neuraminidazę hemaglutyniny, umożliwiającą adhezję wirusa do komórki przez wiązanie do kwasu siałowego oraz białko fuzyjne, odpowiedzialne za fuzję błon komórkowych [50]. Innym wirusem, który również stosowano do fuzji komórek i otrzymywania hybrydom jest wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej VSV (vesicular stomatitis virus) [45]. Zastosowanie zarówno wirusa Sendai jak i VSV pozwala na otrzymanie podobnej liczby klonów hybrydom wytwarzających swoiste przeciwciała. Badania nad wpływem zastosowanych metod fuzji na klasę wytwarzanych przeciwciał wskazują, że dominującą klasą przeciwciał wytwarzanych przez hybrydomy otrzymane za pomocą wirusa Sendai jest IgM, natomiast większość klonów otrzymanych z zastosowaniem VSV wytwarza przeciwciała klasy IgG [45]. Wykorzystanie wirusów do otrzymywania hybrydom zostało jednak zastąpione przez użycie glikolu polietylenowego.

Glikol polietylenowy (PEG)

Fuzję komórek indukowaną PEG opisano po raz pierwszy w 1975 r. [1]. Od tego czasu PEG jest najczęściej stosowanym induktorem fuzji do różnych typów komórek, a przede wszystkim do uzyskiwania hybrydom wytwarzających przeciwciała monoklonalne. Mechanizm fu-

zji indukowanej glikolem polietylenowym nie został dokładnie zbadany. Istnieje przypuszczenie, że cząsteczki PEG-u przez wiązanie dużej liczby cząsteczek wody, zmniejszają ich aktywność fizyko-chemiczną, co skutkuje dehydratacją błon komórkowych ułatwiającą ich wzajemne łączenie się. [39].

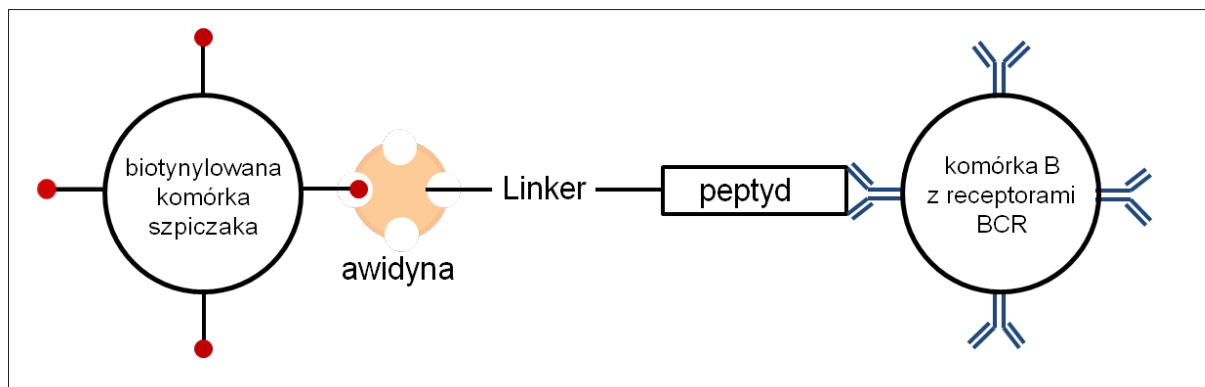
W 1982 r. zaproponowano udoskonalenie metody z użyciem PEG-u przez wymuszenie zbliżenia komórek B swoistych do antygeny użytego do immunizacji z komórkami szpiczaka. Cząsteczki antygeny były chemicznie sprzęgane z białkami obecnymi na powierzchni komórek szpiczaka. Limfocyty B wyizolowane ze śledziony szczepionych myszy, oddziaływały z antygenem prezentowanym na powierzchni komórek szpiczaka za pośrednictwem obecnych na ich powierzchni receptorów BCR tego antygeny. Zmniejszenie odległości między komórkami wytwarzającymi swoiste przeciwciała i komórkami szpiczaka, istotnie zwiększyło wydajność fuzji [36].

Elektrofuzja

Jedną z technik wykorzystywanych do fuzji limfocytów B z komórkami szpiczaka jest elektrofuzja. Opiera się na wykorzystaniu impulsu elektrycznego, który wprowadza perforacje do błony komórkowej komórek uczestniczących w fuzji. W wyniku tego procesu błony komórkowe obydwu typów komórek mogą się łączyć prowadząc w rezultacie do powstania heterokarionu. Metoda została opisana po raz pierwszy w 1982 r. przez Veinekena i Zimmermana [57].

Wykazano, że elektrofuzja daje lepsze rezultaty niż stosowanie PEG-u [12]. Dzieje się tak dlatego, że najbardziej efektywna fuzja w wyniku zastosowania impulsu elektrycznego zachodzi między komórkami o podobnych rozmiarach. Większość z pobranych ze śledziony komórek to nieaktywne limfocyty T i B. Mają mniejsze rozmiary w porównaniu z aktywowanymi limfocytami B i komórkami szpiczaka, których rozmiary są podobne. W wyniku elektrofuzji zmniejsza się prawdopodobieństwo fuzji komórek szpiczaka z nieaktywowanymi limfocytami i procent uzyskanych pozytywnych hybrydom wzrasta [12]. Istnieją różne techniki oparte na zastosowaniu elektrofuzji wykorzystujące dodatkowe mechanizmy.

Ciekawy eksperyment przedstawiający otrzymywanie przeciwciał rozpoznających presenilinę 1 został wykonany przez Tomita M. i wsp. w 2000 r. Aby zwiększyć wydajność fuzji wykorzystano opisane wcześniej wymuszone zbliżenie komórek B z komórkami szpiczaka przez oddziaływanie z receptorami BCR limfocytów. Antygen użyty w doświadczeniu był peptydowym fragmentem perseniliny 1, który sprzęgnięto przez dwufunkcyjny linker MBS (m-maleimidobenzilo N-hydroksysukcynimid) z awidyną, a komórki szpiczaka poddano biotynylacji. Funkcjonalizowany peptyd był rozpoznawany przez swoiste dla niego receptory obecne na splenocytach, natomiast komórki szpiczaka były przyłączane poprzez oddziaływanie biotyny z awidyną. Schemat eksperymentu przedstawiono na ryc.1. Fuzję wymuszano za



Ryc. 1. Sposób wymuszonego zbliżenia komórek szpiczaka ze swoistymi komórkami B (schemat)

pomocą urządzenia do wytwarzania impulsu elektrycznego - BTX T820. Jednocześnie przeprowadzono fuzję według standardowego protokołu w celu porównania obu metod. Z uzyskanych danych wynikało, że zmodyfikowana metoda z wykorzystaniem impulsu elektrycznego charakteryzowała się 5-40 razy większą wydajnością w otrzymywaniu hybrydom wytwarzających swoiste przeciwciała niż standardowa metoda z zastosowaniem PEG-u [55].

Fuzja komórek wytwarzających zdefiniowane izotypy przeciwciał

W procesie otrzymywania przeciwciał monoklonalnych za pomocą fuzji komórek z zastosowaniem PEG-u otrzymuje się klony komórek hybrydomalnych wytwarzających różne izotypy przeciwciał z przewagą przeciwciał klasy IgG. Wpływ na to mają różne czynniki, takie jak czas trwania i liczba immunizacji, jak również rodzaj zastosowanego antygeny [4]. Najczęściej oczekiwanym izotopem przeciwciał jest IgG. Zaletami IgG jest ich niewielka masa cząsteczkowa, w porównaniu z IgM, oraz łatwiejsze oczyszczanie. Dowiedzono również, że IgG wykazują się większym powinowactwem do antygeny niż IgM [4]. Apiratmatekul i wsp. opracowali metodę pozwalającą na otrzymanie przeciwciał o wybranym izotypie (IgM, IgG). Zasada metody jest oparta na selekcji limfocytów ekspresjonujących na powierzchni przeciwciała o izotypie IgM lub IgG z wykorzystaniem magnetycznych cząstek pokrytych przeciwciałami anti-IgM lub anti-IgG. Selekcja odbywa się przez sortowanie magnetyczne w systemie MACS (magnetic cell sorting system). Wyselekcjonowaną populację poddaje się fuzji z komórkami szpiczaka otrzymując hybrydomy wytwarzające wybrane klasy przeciwciał. Apiratmatekul i wsp. wyizolowali splenocyty myszy poddanej wcześniej immunizacji i wyselekcjonowali z nich populacje ekspresjonujące na powierzchni przeciwciała IgM (populacja IgM+) i IgG (populacja IgG+). Poddając wyselekcjonowane populacje splenocytów fuzji otrzymali klony komórek hybrydomalnych wytwarzające przeciwciała monoklonalne. Aż 85% klonów powstałych w wyniku fuzji szpiczaka i splenocytów IgM+ wytwarzało przeciwciała klasy IgM, natomiast żaden klon spośród otrzymanych

w wyniku fuzji szpiczaka ze splenocytami IgG+ nie wytwarzało przeciwciał klasy IgM [4]. Badania te dowodzą, że wykorzystując metodę fuzji szpiczaka z wyselekcjonowanymi limfocytami można otrzymywać przeciwciała monoklonalne o zadanych izotypach.

Wytwarzanie przeciwciał niewymagające fuzji komórek

Istotnym ograniczeniem technologii opartej na komórkach hybrydoma jest ich genetyczna niestabilność oraz potrzeba stosowania komórek wspomagających wzrost hybrydom np. makrofagów otrzewnowych oraz mała wydajność udanych fuzji. Od niedawna istnieje możliwość otrzymania nieśmiertelnych splenocytów wytwarzających przeciwciała bez konieczności ich fuzji z komórkami szpiczaka. Odkryto, że hodowle limfocytów izolowanych z myszy transgenicznej (H-2K^b-tsA58), mającej wbudowaną w genom sekwencję kodującą duży T-antygen wirusa SV40 są nieśmiertelne jeśli komórki hoduje się w odpowiednich warunkach temperaturowych. Komórki B wyizolowane ze śledziony myszy po immunizacji antygenem, hodowane w odpowiednich warunkach mogą wytwarzać swoiste przeciwciała bez ograniczeń wynikających z krótkiej przeżywalności w hodowli. Wykorzystując tę metodę udało się uzyskać linie komórek B wytwarzające przeciwciała monoklonalne rozpoznające białko pIII kapsydu bakteriofaga [47]. Za pomocą tej metody można uzyskiwać wysokie miana przeciwciał zarówno poli- jak i monoklonalnych. Ważną zaletą metody jest to, że w przeciwieństwie do komórek hybrydomalnych różnice w szybkości wzrostu między komórkami wytwarzającymi i niewytwarzającymi przeciwciała są niewielkie. Otrzymane w ten sposób splenocyty uzyskują nieograniczoną liczbę podziałów (nieśmiertelność) gdy są hodowane w temp. 33°C i zachowują stabilność genetyczną, co umożliwia pozyskiwanie przeciwciał o określonych parametrach i właściwościach przez dłuższy czas z tej samej hodowli. Ponadto krzyżówka wyżej wymienionego szczepu myszy z myszą ekspresjonującą ludzkie przeciwciała może umożliwić otrzymywanie taką metodą nieśmiertelnych splenocytów wytwarzających ludzkie przeciwciała monoklonalne [47].

Medium hodowlane

Do hodowli komórek hybrydomalnych stosuje się media, takie jak RPMI- 1640, DMEM, IMDM, zawierające glukozę, aminokwasy, witaminy oraz niezbędne sole mineralne. Media hodowlane różnią się składem i proporcjami wyżej wymienionych substancji. Bardzo ważnym suplementem medium hodowlanego w hodowlach komórek hybrydomalnych jest surowica. Jest to bardzo złożona i zróżnicowana mieszanina składników, takich jak białka (albumina, transferryna), lipoproteiny, hormony oraz czynniki wzrostowe. Zastosowanie surowicy w medium hodowlanym zapewnia prawidłowy wzrost wielu linii komórkowych, jednak wiąże się z pewnymi utrudnieniami, takimi jak: możliwość wprowadzenia do hodowli wirusów lub mikoplazmy, zanieczyszczenia przeciwciałami surowiczymi czy duży koszt produkcji przeciwciał na dużą skalę. Z tych przyczyn prowadzi się badania nad opracowaniem pożywek do hodowli komórkowych niewymagających suplementacji surowicą [13].

Na podstawie doświadczeń wykonywanych na pięciu różnych klonach komórek hybrydomalnych ustalono, iż czynnikami niezbędnymi do utrzymania komórek w hodowli, zdolnymi rekompensować brak surowicy są insulina i transferryna. Badania nad suplementacją pożywki insuliną i transferryną w zakresie 0-50 µg/ml pozwoliły ustalić optymalne stężenie na 5-10 µg/ml. Czas podziału komórek hybrydomalnych hodowanych w medium bez surowicy z dodatkiem insuliny i transferryny w stężeniach 5 µg/ml był 3-krotnie dłuższy od czasu podziału tych samych komórek hodowanych w medium zawierającym 20% FCS. Prowadząc hodowlę bez surowicy, z dodatkiem insuliny i transferryny, można namnożyć komórki do takiej samej gęstości jak w medium zawierającym surowicę, lecz w dłuższym czasie. Komórki wytwarzają przeciwciała w prawie identycznych ilościach w medium zawierającym i niezawierającym surowicy, ale z dodatkiem

insuliny i transferryny. Stosowanie medium niezawierającego surowicy daje możliwość otrzymywania przeciwciał na antygeny, które są obecne w surowicy oraz ułatwia proces oczyszczania przeciwciał z płynu hodowlanego, który w tym przypadku nie zawiera białek i przeciwciał obecnych w surowicy [13]. Wady i korzyści wynikające ze stosowania medium niezawierającego surowicy zebrano w tabeli 1.

Sposoby selekcji pozytywnych hybrydom

W kolejnym etapie uzyskane hybrydomy poddaje się selekcji i klonowaniu celem uzyskania monoklonalnych linii komórkowych wytwarzających przeciwciała o jednokowej swoistości. Do przeprowadzenia selekcji niezbędne są techniki analityczne pozwalające na wykrycie komórek lub klonów wytwarzających pożądane przeciwciała, a klonowanie polega na wyprowadzeniu hodowli hybrydom z pojedynczej komórki. Jeśli zastosowana technika pozwala wykryć pożądane hybrydomy na poziomie pojedynczej komórki (np. FACS) możliwe jest wykonanie selekcji i klonowania w ramach jednego procesu. Standardowa, obecnie najczęściej stosowana, technika opiera się na klonowaniu metodą rozcieńczeń (opisana dalej), propagacji komórek, selekcji produktywnych klonów, na podstawie wyników analiz (zwykle test ELISA) płynu hodowlanego.

W pierwszym eksperymencie Kohler i Milstein hodowali hybrydomy na podłożu z miękkim agarem. Celem eksperymentu było uzyskanie hybrydom wytwarzających przeciwciała rozpoznające owcze czerwone krwinki – SRBC, które były użyte jako antygen do szczepienia myszy. Podłoże zawierało komórki SRBC, a wytwarzane przez hybrydomy przeciwciała anty-SRBC przyłączały się do ich powierzchni i aktywowały obecny w medium dopełniacz. Wskutek tego następowała liza komórek i widoczne gołym okiem łysinki wokół pozytywnych klonów hybrydom [35].

Obecnie jest dostępnych wiele różnorodnych metod pozwalających na szybką analizę i sortowanie wielu rodzajów komórek. Najpowszechniej stosowaną techniką jest cytometria przepływowa, opierająca się na analizie ekspresji białek powierzchniowych. Pozwala na analizę przesiewową milionów komórek w krótkim czasie. Niestety metoda ta nie jest wystarczająco efektywna w przypadku hybrydom, ponieważ tylko niewielka część hybrydom prezentuje na powierzchni błony komórkowej wytwarzane przez siebie przeciwciała.

Limfocyty B, oprócz przeciwciał wydzielanych na zewnątrz komórki, ekspresjonują wytwarzane przeciwciała w postaci związanej z błoną komórkową, jako receptor limfocytów B - BCR (B-cell receptor). Na BCR składa się cząsteczka przeciwciała z domeną błonową oraz dwa dodatkowe łańcuchy polipeptydowe Igα (CD79a) i Igβ (CD79b). Przeciwciała wchodzące w skład BCR ma takie samo powinowactwo i swoistość względem antygeny jak w przypadku przeciwciał wydzielanych na zewnątrz komórki. Są także identyczne pod względem klasy, np. komórka B mająca BCR zbudowany z przeciwciała klasy IgM wydziela przeciwciała

Tabela 1. Wady i zalety stosowania medium niezawierającego surowicy [13]

Zalety	Wady
1. Zmniejszone ryzyko zakażenia medium patogenami	1. Nie wszystkie linie komórkowe można hodować w medium bez surowicy
2. Uproszczenie procesu oczyszczania przeciwciał związane z brakiem obecności surowicznych immunoglobulin	2. Hodowle komórkowe mogą nie osiągać takiej gęstości w zadanym czasie jak w przypadku medium z surowicą
3. Uproszczenie składu medium hodowlanego;	3. Ceny komercyjnie dostępnych pożywek bezsurowicznych są wyższe
4. Możliwość dokładnego określenia składu medium hodowlanego	
5. Mniejsze koszty w przypadku suplementacji hodowli insuliną i transferryną	
6. Zwiększona wydajność hodowli	
7. Brak konieczności wykorzystania zwierząt do produkcji surowicy	

klasy IgM [4]. W miarę dojrzewania komórek B, którego końcowym stadium są komórki plazmatyczne, zanika ekspresja receptorów BCR na powierzchni błony komórkowej. W następstwie, hybrydomy również w niewielkim stopniu ekspresjonują na swej powierzchni przeciwciała w postaci tego receptora [44,51]. Badania wskazują również na różny stopień lub brak korelacji między wytwarzaniem przeciwciała a ekspresją BCR wśród różnych klonów hybrydom [16,42,49,52]. Zestawienie tych badań wskazuje, że stopień korelacji między liczbą przeciwciał błonowych i wydzielanych jest różny dla różnych linii komórek hybrydomalnych. Istotny wpływ na to zjawisko ma mechanizm formowania się BCR. Receptor ten jedynie w kompletnej postaci jest w stanie opuścić retikulum endoplazmatyczne i zostać wyeksponowany na zewnątrz błony komórkowej [10]. Badania przeprowadzone na wielu liniach komórek hybrydomalnych dowiodły, iż czynnikiem ograniczającym formowanie się BCR jest niski poziom ekspresji Ig α [49].

Aby umożliwić pełną ekspresję BCR w komórkach hybrydomalnych opracowano zmodyfikowaną linię szpiczaka jako partnera fuzji. Price i wsp. zmodyfikowali linię SP2/0 przez transfekcję komórek tej linii z wykorzystaniem cDNA kodującego łańcuch ciężki błonowego izowariantu przeciwciała oraz łańcuchy polipeptydowe Ig α i Ig β [49]. Powstała w ten sposób linia SP2ab pozwala na otrzymywanie hybrydom ekspresjonujących na swojej powierzchni przeciwciała w postaci BCR, dzięki czemu jest możliwa ich selekcja za pomocą cytometrii przepływowej. Badacze zaproponowali zastosowanie wyznakowanego fluorescencyjnie antygeny do barwienia immunofluorescencyjnego komórek hybrydomalnych oraz ich późniejszą selekcję za pomocą techniki FACS (fluorescence-activated cell sorting). Skuteczność metody została omówiona na przykładzie, w którym selekcjonowano hybrydomy wytwarzające przeciwciała na białko wirusa grypy typu A (otrzymano 35 klonów), a także krótkiego peptydu wirusa HSV-2 gG [49].

LDC (limiting dilution cloning)

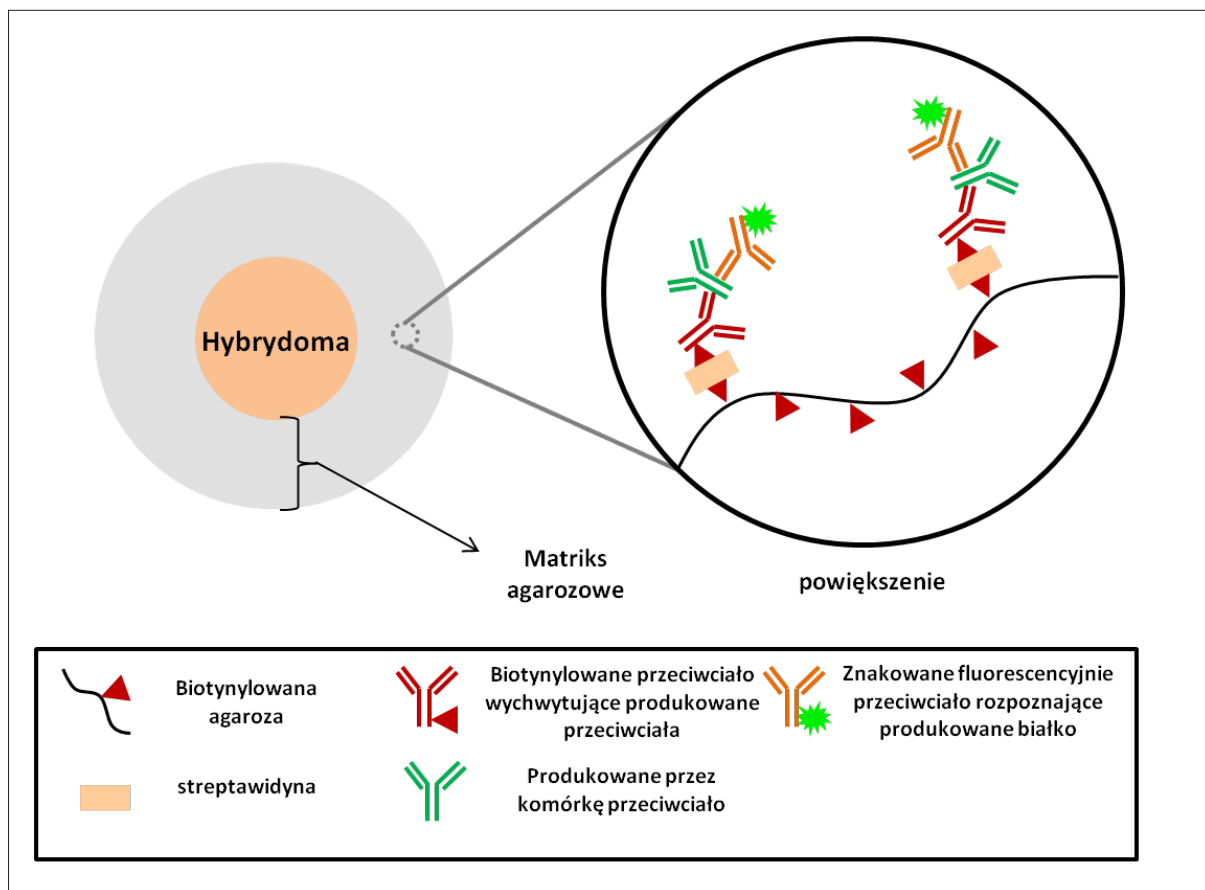
Jak wcześniej wspomniano, wyprowadzanie klonów i selekcję hybrydom wykonuje się najczęściej metodą seryjnych rozcieńczeń. Klonowanie za pomocą tej techniki polega na wysiewaniu na płytkę wielodołkową zawiesiny odpowiednio rozcieńczonych komórek tak, aby na jeden dołek przypadała średnio mniej niż 1 komórka. Przyjmuje się, że studzienki zawierają pojedynczy klon jeśli wzrost komórek obserwuje się w postaci pojedynczej kolonii. Supernatant pobrany z wytypowanych studzienek analizuje się pod kątem obecności swoistych przeciwciał za pomocą testu ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Kolonie wykazujące się odpowiednim wzrostem i wysokim poziomem wytwarzanych przeciwciał poddaje się powtórzonemu klonowaniu, aby uzyskać pewność, że wyprowadzona linia jest rzeczywiście monoklonalna. Otrzymane w ten sposób komórki są następnie namnażane *in vitro* lub *in vivo*. Metoda LDC wymaga dużego nakładu pracy, czasu i jest stosunkowo małoprzepustowa. Konieczność analizy produktów znacznej liczby klonów (zwłaszcza po kolejnym klonowaniu) i związane z tym trudności mogą

spowodować utratę części produktywnych komórek, z których każda może wytwarzać przeciwciała o unikalnych właściwościach. Co więcej, dokładne analizy klonów otrzymanych metodą LDC wskazują na częsty brak monoklonalności mimo kilkukrotnych powtórzeń klonowania [17,56]. Najważniejszymi zaletami LDC są przede wszystkim łatwość wykonania i brak konieczności korzystania z kosztownych urządzeń. Z powodu wspomnianych wad metody LDC, są rozwijane metody alternatywne.

Selekcja na podłożu półstałym

Niektóre metody selekcji wykorzystują podobnie jak Kohler i Milstein hodowlę na podłożu półstałym. W metodzie tej, zawiesina hybrydom jest rozdyspergowana w gęstym podłożu np. na bazie metylocelulozy, które tężeje po wylaniu na szalkę hodowlaną. Komórki nie mogą się przemieszczać i rosną w postaci zwartych, oddzielonych od siebie kolonii. Przy założeniu, że komórki były dobrze rozdyspergowane w medium przed umieszczeniem hodowli w płytce, istnieje duże prawdopodobieństwo, że kolonie reprezentują pojedyncze klony. Następnie kolonie są przenoszone za pomocą pipety do hodowli płynnej i po ich propagacji analizuje się supernatant pod kątem obecności poszukiwanych przeciwciał. Technika ta jest nieco trudniejsza w wykonaniu niż opisana wyżej, jednak po jej dobrym opanowaniu pozwala zmniejszyć znacznie nakład pracy. Inną zaletą takiego sposobu selekcji w porównaniu z hodowlą płynną jest to, że nie trzeba wymieniać medium i wielokrotnie rozcieńczać hodowlę w medium, co zmniejsza koszty. Metoda jest więc bardziej efektywna i zmniejsza ryzyko zakażenia hodowli [60]. Istotne też jest to, że rozdzielenie komórek hybrydoma właściwie zaraz po fuzji niweluje ryzyko przerośnięcia wolno rosnących klonów przez klony szybko rosnące, które często są mniej produktywnie. Badania nad wzrostem hybrydom i ekspresją przez nie przeciwciał wskazują, że istnieje odwrotnie proporcjonalna zależność między tempem wzrostu komórek i wytwarzaniem przeciwciał. Im szybciej linia komórek rośnie, tym mniej wytwarza przeciwciał [26]. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być to, że komórki o niskim tempie wzrostu spędzają więcej czasu w fazie G1. Fazy G1, S i w niektórych liniach G2, sprzyjają translacji i sekrecji białek [6,26]. Hodowle, w których zahamowano podział komórek cechują się większym wytwarzaniem przeciwciał niż hodowle komórek dzielących się [26]. Zjawisko to jest również wyjaśniane tym, iż synteza przeciwciał jest dla hybrydomy dużym obciążeniem. Wytwarzane przez dojrzałe limfocyty B przeciwciała stanowią 50% całkowitej syntezy białka. Komórki, które nie dziedziczą materiału genetycznego odpowiedzialnego za produkcję przeciwciał zyskują dodatkową energię i substraty, które przyspieszają ich wzrost [6]. Czynniki, które spowalniają wzrost komórek, takie jak niższe pH (np. pH 6,8), czy tymidyna, sprzyjają wytwarzaniu przeciwciał. Natomiast czynniki sprzyjające wzrostowi komórek, takie jak pH 7,2 lub duże stężenia surowicy w medium powodują spadek produktywności [26].

Podłoża półstałe mogą być przygotowane z wykorzystaniem agaru, agarozы lub metylocelulozy. Liczne badania wykazały, że najlepsze rezultaty osiąga się stosując me-



Ryc. 2. Znakowanie immunofluorescencyjne mikrosfer zawierających hybridomy wytwarzające przeciwciała monoklonalne stosowane w metodzie GMT

tylocelulozę [48]. Jej głównymi zaletami są: duża lepkość i inertyność - nie wchodzi w reakcję z cytokinami i innymi czynnikami dodawanymi do medium oraz nie oddziałuje z białkami wytwarzanymi przez hodowane komórki, jak również minimalizuje dyfuzję wytwarzanych białek [21]. Metyloceluloza jest transparentna, dzięki czemu nawet małe kolonie są dobrze widoczne [60].

GMT (gel microdrop technology)

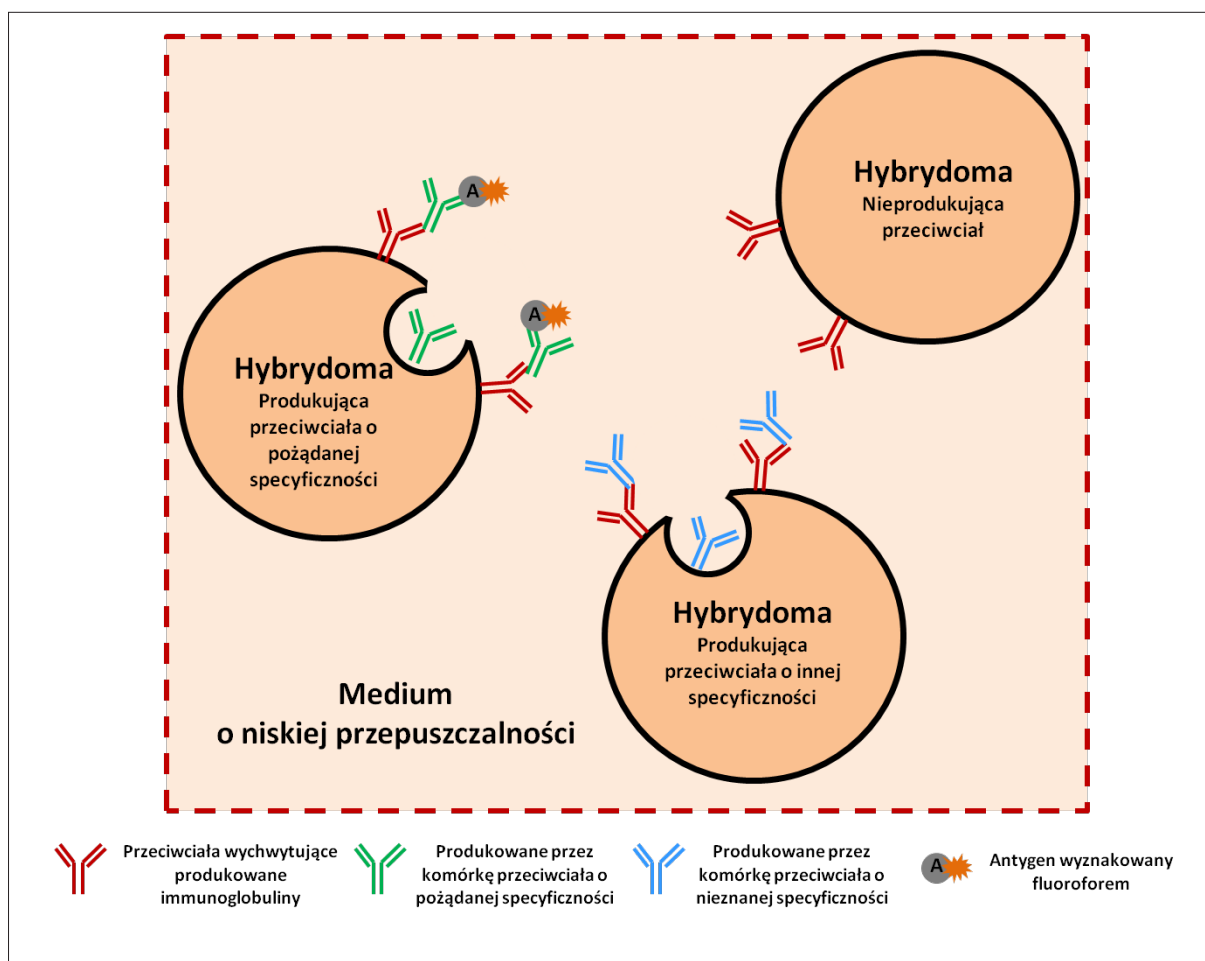
W technice GMT komórki wytwarzające poszukiwane cząsteczki są selekcjonowane za pomocą sortera (FACS). W celu wyznakowania wydzielanych przez nie cząsteczek komórki kapsułkuje się w biotynylowanym agarozowym matriks. Wytworzone mikrosfery funkcjonalizuje się biotynylowanymi przeciwciałami wiążącymi cząsteczki wytwarzane przez komórki, które przez awidynę lub streptawidynę łączą się z biotynylowanym matriks. Wydzielane przez komórki cząsteczki są wychwytywane przez immobilizowane przeciwciała wychwytyjące, po czym wybarwiane fluoroforem sprzężonym z cząsteczką reporterową (np. przeciwciałem). Tak wyznakowane mikrosfery poddaje się analizie i sortowaniu za pomocą FACS (ryc.2) [5].

Technika GMT w nieco innej, początkowej wersji była wykorzystywana do izolacji szybko rosnących populacji bakterii, później została przystosowana do selekcji hybridom [11,59].

Jedną z pierwszych prac opisującą zastosowanie GMT do izolacji komórek hybridomalnych prezentowała selekcję hybridom pochodzących z jednego klonu, lecz ekspresjonujących różne klasy przeciwciał z powodu zjawiska przełączania klas [2]. W zależności od aranżacji układu, można tą techniką przeprowadzać selekcję komórek na podstawie ilości wytwarzanych przez nie przeciwciał, ich swoistości lub klasy. Istotne jest, że metoda znakowania nie wpływa negatywnie na żywotność komórki lub komórek zamkniętych w mikrosferze [5]. Wykorzystując technikę GMT można uzyskać klony zdolne do 5-6-krotnie większego wytwarzania przeciwciał niż w technice LDC [32]. Wadą technologii GMT jest potrzeba optymalizacji protokołu dla każdej linii komórek, a także duże zużycie medium. W celu zapewnienia monoklonalności proces kapsułkowania prowadzi się przy znacznym rozcieńczeniu komórek, skutkiem czego jedynie 10-15% mikrosfer zawiera komórki [21]. Niektóre rodzaje komórek np. NS0 - linia powszechnie wykorzystywana do ekspresji rekombinowanych białek, źle znoszą proces kapsułkowania wykazując obniżoną żywotność [21].

MBSA - matrix-based selection assay

W metodzie tej immunoglobuliny wychwytyjące wydzielane przez hybridomy przeciwciała sprzęga się chemicznie do błony komórkowej. Komórki są umieszczane w medium hodowlanym o dużej lepkości, np. zawierają-



Ryc. 3. Barwienie immunofluorescencyjne hybrydom wytwarzających przeciwciała o pożądanej swoistości stosowane w metodzie MBSA

cym 25-40% żelatyny, by spowolnić dyfuzję wydzielonych przeciwciał i umożliwić ich wychwycenie przez przeciwciała immobilizowane na błonie komórkowej (ryc.3). Po usunięciu komórek z medium, są barwione immunofluorescencyjnie wyznakowanym antygenem lub przeciwciałem rozpoznającym wytwarzane immunoglobuliny [41]. Znakowane komórki mogą być analizowane i sortowane w każdym cytometrze przepływowym. Metoda nie wymaga dodatkowych operacji np. usuwania otaczającego komórki mikrożelu, jak w przypadku technologii GMT [8]. Selekcjonowanie można przeprowadzać na podstawie ilości produkowanych przez komórki przeciwciał, stosując do znakowania nieodpowiedni antygen, lecz immunoglobuliny. Wówczas swoistość bada się np. za pomocą testu ELISA. Udokumentowano, że stosując technikę MBSA uzyskano klony wytwarzające 5 razy więcej przeciwciał niż klony uzyskane techniką LDC [8].

STOSOWANE SYSTEMY SELEKCJI KOMÓREK

LEAP™ Cell Processing Workstation firmy Cytellect to urządzenie do przyżyciowej analizy i sortowania komórek, najbardziej zaawansowany, dostępny komercyjnie, system do selekcji komórek bezpośrednio w naczyniach hodowla-

nych. System umożliwia obserwacje, pomiary, prowadzenie eksperymentów na kulturach komórkowych w izolowanym środowisku z zastosowaniem standardowych naczyń hodowlanych, np. płytek 96-dołkowych. Jest wyposażony w laser, dzięki któremu można prowadzić eliminację niepożądanych komórek przez ich naświetlenie intensywnym impulsem świetlnym. Jest przede wszystkim stosowany do oczyszczania kultur komórkowych z niepożądanych komórek. Głównie jest przeznaczony do pracy z komórkami macierzystymi. Jedną z aplikacji jest selekcja hybrydom wytwarzających przeciwciała monoklonalne. Wykrywanie hybrydom wytwarzających pożądane przeciwciała odbywa się, podobnie jak w metodach opisanych wyżej, przez znakowanie fluorescencyjne. Wyniki uzyskane z użyciem tego urządzenia wykazały, że jest możliwa selekcja klonów wytwarzających 5-20 razy więcej pożądanych przeciwciał niż techniką LDC [21]. Wadą systemu jest możliwość uszkodzenia hybrydom wytwarzających pożądane przeciwciała podczas niszczenia pozostałych komórek [11].

Dostępne są również urządzenia do automatycznej izolacji kolonii umożliwiające przeniesienie komórek wytwarzających pożądane białko. Komórki w postaci kolonii rosnących na podłożu półstałym wydzielają białko, które

Tabela 2. Różne systemy hodowli hybridom *in vitro* oraz stężenia otrzymywanych przeciwciał (wg [43])

Rodzaj hodowli	Przykłady	Średnie otrzymywane stężenie mAb	Maksymalne stężenie mAb w hodowli
Hodowla w zawieszynie	Butelka hodowlana (np. T-75)	50 µg/ml	<100 µg/ml
Hodowla w systemie membranowym	Bioreaktor membranowy	200 µg/ml	<500 µg/ml
Hodowla w systemie kapilarnym	Bioreaktor typu „hollow-fiber”	1 mg/ml	<5 mg/ml

reaguje z rozpoznającym je przeciwciałem znakowanym fluorescencyjnie. W wyniku tego, dookoła rosnącej kolonii powstaje fluorescencyjne halo, które jest następnie analizowane przez program komputerowy. Algorytmy pozwalające na wybór odpowiedniej kolonii uwzględniają takie parametry jak wielkość kolonii, średnicę fluorescencyjnego halo, a także wzajemny stosunek tych parametrów. Kolonie spełniające zadane kryteria są wybierane i przenoszone do oddzielnych naczyń hodowlanych. Przykładami urządzeń tego typu są ClonePix firmy Genetix oraz CellCollector™ firmy Aviso [21].

Wytwarzanie przeciwciał

Wyprowadzenie linii komórek hybridoma wytwarzającej przeciwciała o pożądanej swoistości jest głównym etapem w procesie wytwarzania mAb. Jednak uzyskanie znaczących ilości przeciwciał oraz ich oczyszczanie to kolejne wyzwania technologiczne. Są to m.in. zapewnienie i kontrola stabilności genetycznej wyprowadzonego klonu, opracowanie technologii produkcji na dużą skalę, technologia usuwania zanieczyszczeń obecnych w preparatach pochodzących np. z surowicy stosowanej do hodowli itd. Jeszcze innym zagadnieniem jest przystosowanie przeciwciał do aplikacji w terapii. Przeciwciała monoklonalne wytwarzane przez komórki mysie są dla organizmów ludzi obcym białkiem i wzbudzają reakcję odpornościową. Rozwiązaniem jest m.in. tzw. humanizacja przeciwciał polegająca na wstawieniu w sekwencję ludzkiej immunoglobuliny jedynie krótkich fragmentów tworzących miejsce wiązania antygeny, pochodzących z mysich przeciwciał monoklonalnych. Zagadnienia związane z humanizacją przeciwciał monoklonalnych można znaleźć w innych publikacjach przeglądowych. W artykule krótko opisano podstawowe metody przygotowania preparatów przeciwciał monoklonalnych syntezowanych przez linie hybridoma.

Metoda *in vitro*

Metoda polega na zbieraniu płynu hodowlanego, do którego są wydzielane przeciwciała. Najistotniejsze jest więc opracowanie odpowiednich procedur hodowli zapewniających optymalny wzrost komórek i wydajną syntezę przez nie przeciwciał przy jak najmniejszym zużyciu kosztownego medium. Przy niewielkiej skali wystarczają standardowe naczynia do hodowli komórkowych. W razie potrzeby uzyskania większych ilości przeciwciał hybridomy można hodować w bioreaktorach. Są też komercyjnie dostępne

systemy przeznaczone do hodowli hybridom, które zawierają np. półprzepuszczalne membrany umożliwiające wymianę medium, czy pobieranie medium wzbogaconego w przeciwciała bez usuwania komórek z naczynia. Odpowiednie membrany zapewniają też wydajną wymianę gazową dzięki czemu można uzyskać dużą gęstość komórek. Jeśli w naczyniu hodowlanym zaszczepia się niewielką liczbę komórek, może zaistnieć potrzeba wysiania wcześniej komórek odżywczych pochodzących z jamy otrzewnowej myszy tego samego szczepu. Prowadząc hodowlę komórek w typowym naczyniu do hodowli komórkowych można uzyskać 10-100 µg przeciwciał na mililitr medium hodowlanego [24]. Lepsze wyniki uzyskuje się stosując specjalistyczne systemy (tabela 2).

Metoda *in vivo*

Najwydajniejszą metodą uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych jest implementacja komórek hybridoma do jamy otrzewnowej myszy. Powstaje wówczas nowotwór wytwarzający płyn wysiękowy bogaty w przeciwciała wydzielane przez hybridomy. Istotna jest zgodność genetyczna komórek hybridomalnych i organizmu gospodarza. W razie jego braku organizm gospodarza odrzuci wstrzyknięte komórki zanim otrzymają się wysięk [24]. Dlatego do eksperymentu dobiera się myszy tego samego, wsobnego szczepu co zwierzęta, które były źródłem splenocytów użytych do fuzji. Najczęściej są to myszy szczepu Balb/C, ze względu na ich kompatybilność z najpopularniejszą linią szpiczaka – SP2/0. Przed implementacją komórek hybridoma myszy poddaje się zabiegowi przygotowawczemu (priming), polega to na podaniu do jamy otrzewnowej czynnika ułatwiającego implementację komórek hybridoma i ich wzrost nie w postaci litego guza, lecz w postaci sprzyjającej wydzielaniu dużej ilości płynu wysiękowego. Zwykle używa się 2,6,10,14-tetrametylopentadekanu (Pristan), ale stosuje się też inne substancje np. adiuwant Freund'a, tioglikolan, oleje roślinne i mineralny. Pristan podrażnia otrzewną oraz powoduje wydzielanie płynu do jamy otrzewnowej i supresję odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko rosnącym hybridomom [27,28]. Po upływie 1-4 tygodni myszom wstrzykuje się 10^5 - 10^6 komórek hybridoma w logarytmicznej fazie wzrostu, zawieszonych w 2 ml PBS. Wstrzyknięta zawiesina nie powinna zawierać resztek surowicy obecnej w medium, ponieważ może to spowodować wytwarzanie dodatkowych przeciwciał rozpoznających białka surowicy. Po około 2

tygodniach pobiera się płyn wysiękowy po uprzedniej eutanazji zwierzęcia. Płyn wysiękowy zawiera znacznie więcej przeciwciał niż płyny hodowlane, ich koncentracja zwykle wynosi 3-15 mg/ml [24].

Przeciwciała uzyskane z płynów hodowlanych i wysiękowych oczyszcza się następnie znanymi technikami biochemicznymi, takimi jak: wysalanie siarczanem amonu, chromatografia powinowactwa na złożach z immobilizowanym antygenem lub białkami wiążącymi przeciwciała (białko G, A i in.), chromatografia sitowa, jonowymienna, ultrafiltracja i inne. Metodyka oczyszczania jest dobierana w zależności od wymagań dotyczących czystości, ilości oraz kosztów i innych parametrów. Preparatyka przeciwciał jest obszernym zagadnieniem, szeroko opisywanym w literaturze naukowej.

PIŚMIENNICTWO

[1] Ahkong Q.F., Fisher D., Tampion W., Lucy J.A.: Mechanisms of cell fusion. *Nature*, 1975, 253: 194-195

[2] Akselband Y., Moen P.T.Jr., McGrath P.: Isolation of rare isotype switch variants in hybridoma cell lines using an agarose gel microdrop-based protein secretion assay. *Assay Drug Dev. Technol.*, 2003, 1: 619-626

[3] Alberts B., Johnson A., Lewis J.: *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, New York 2002

[4] Apiratmateekul N., Phunpae P., Kasinrerak W.: A modified hybridoma technique for production of monoclonal antibodies having desired isotypes. *Cytotechnology*, 2009, 60: 45-51

[5] Atochina O., Mylvaganam R., Akselband Y., McGrath P.: Comparison of results using the gel microdrop cytokine secretion assay with ELISPOT and intracellular cytokine staining assay. *Cytokine*, 2004, 27: 120-128

[6] Barnes L.M., Bentley C.M., Dickson A.J.: Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001; 73: 261-270

[7] Böhm W., Kühröber A., Paier T., Mertens T., Reimann J., Schirmbeck R.: DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after intramuscular injection. *J. Immunol. Methods*, 1996, 193: 29-40

[8] Borth N., Zeyda M., Kunert R., Katinger H.: Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000-2001; 71: 266-273

[9] Boulard C., Lecroisey A.: Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrylamide gel containing small amounts of protein. *J. Immunol. Methods*, 1982, 50: 221-226

[10] Brouns G.S., de Vries E., Borst J.: Assembly and intracellular transport of the human B cell antigen receptor complex. *Int. Immunol.*, 1995, 7: 359-368

[11] Browne S.M., Al-Rubeai M.: Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.*, 2007, 25: 425-432

[12] Chang D.C.: Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. *Biophys. J.*, 1989, 56: 641-652

[13] Chang T.H., Steplewski Z., Koprowski H.: Production of monoclonal antibodies in serum free medium. *J. Immunol. Methods*, 1980, 39: 369-375

[14] Chen Y.S., Hung Y.C., Lin W.H., Huang G.S.: Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the

PODSUMOWANIE

Przeciwciała monoklonalne znajdują szerokie zastosowanie jako narzędzia badawcze i biofarmaceutyki, a ich znaczenie i udział w rynku biotechnologicznym szybko się powiększają. Proces produkcji przeciwciał monoklonalnych jest wieloetapowy, pracochłonny i kosztowny, a każdy etap może mieć znaczący wpływ na jakość produktu i jego opłacalność. W związku z rosnącym zapotrzebowaniem na przeciwciała monoklonalne stale podejmowane są badania i prace nad ulepszeniem stosowanych technik, w nadziei na ich uproszczenie, zmniejszenie pracochłonności, kosztów i ograniczenie liczby niezbędnych zwierząt. Ostatnie osiągnięcia wskazują też na możliwość automatyzacji tego procesu.

antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide. *Nanotechnology*, 2010, 21: 195101

[15] Chiarella P., Fazio V.M.: Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production. *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30: 1303-1310

[16] Coco Martin J.M., Beuvery E.C.: Stability of monoclonal antibody production in hybridoma cell culture. W: Al-Rubeai M., Emery N.A.: *Flow cytometry applications in cell culture*. New York: Marcel Dekker, 1996, 85-100

[17] Collier H.A., Collier B.S.: Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. *Methods Enzymol.*, 1986, 121: 412-417

[18] Dale C.J., Thomson S., De Rose R., Ranasinghe C., Medveczky C.J., Pamungkas J., Boyle D.B., Ramshaw I.A., Kent S.J.: Prime-boost strategies in DNA vaccines. *Methods Mol. Med.*, 2006, 127: 171-197

[19] Davis H.L.: Plasmid DNA expression systems for the purpose of immunization. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997, 8: 635-646

[20] De Masi F., Chiarella P., Wilhelm H., Massimi M., Bullard B., Ansorge W., Sawyer A.: High throughput production of mouse monoclonal antibodies using antigen microarrays. *Proteomics*, 2005, 5: 4070-4081

[21] Dharshanan S., Chong H., Hung C.S., Zamrod Z., Kamal N.: Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized monoclonal antibody using Clone Pix FL system and the correlation between exterior median intensity and antibody productivity. *Electron. J. Biotechnol.*, 2011, 14: 7

[22] Ecker D.M., Jones S.D., Levine H.L.: The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, 2015, 7: 9-14

[23] El Bissati K., Zhou Y., Dasgupta D., Cobb D., Dubey J.P., Burkhard P., Lanar D.E., McLeod R.: Effectiveness of a novel immunogenic nanoparticle platform for *Toxoplasma* peptide vaccine in HLA transgenic mice. *Vaccine*, 2014, 32: 3243-3248

[24] Goding J.W.: Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Methods*, 1980, 39: 285-308

[25] Hansel T.T., Kropshofer H., Singer T., Mitchell J.A., George A.J.: The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, 9: 325-338

[26] Hayter P.M., Kirkby N.F., Spier R.E.: Relationship between hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, 14: 454-461

- [27] Hoogenraad N., Helman T., Hoogenraad J.: The effect of pre-injection of mice with pristane on ascites tumour formation and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods*, 1983, 61: 317-320
- [28] Hoogenraad N.J., Wraight C.J.: The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production. *Methods Enzymol.*, 1986, 121: 375-381
- [29] Isaacs J.D.: Antibody engineering to develop new antirheumatic therapies. *Arthritis Res. Ther.*, 2009, 11: 225
- [30] Iwazaki A., Yoshioka M.: 2'-Deoxycytidine decreases the anti-tumor effects of 5-fluorouracil on mouse myeloma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, 33: 1024-1027
- [31] Jiménez-Periáñez A., Abos Gracia B., López Relaña J., Díez-Rivero C.M., Reche P.A., Martínez-Naves E., Matveyeva E., Gómez del Moral M.: Mesoporous silicon microparticles enhance MHC class I cross-antigen presentation by human dendritic cells. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, 2013: 362163
- [32] Kalantarov G.F., Rudchenko S.A., Lobel L., Trakht I.: Development of a fusion partner cell line for efficient production of human monoclonal antibodies from peripheral blood lymphocytes. *Hum. Antibodies*, 2002, 11: 85-96
- [33] Kasinrerik W., Moonsom S., Chawansuntati K.: Production of antibodies by single DNA immunization: comparison of various immunization routes. *Hybrid Hybridomics*, 2002, 21: 287-293
- [34] Keen M.J.: The culture of rat myeloma and rat hybridoma cells in a protein-free medium. *Cytotechnology*, 1995, 17: 193-202
- [35] Köhler G., Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495-497
- [36] Kranz D.M., Billing P.A., Herron J.N., Voss E.W.Jr.: Modified hybridoma methodology; antigen-directed chemically mediated cell fusion. *Immunol. Commun.*, 1980, 9: 639-651
- [37] Krpetić Z., Porta F., Caneva E., Dal Santo V., Scarì G.: Phagocytosis of biocompatible gold nanoparticles. *Langmuir*, 2010, 26: 14799-14805
- [38] Lanzavecchia A., Sallusto F.: Human B cell memory. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009, 21: 298-304
- [39] Lentz B.R.: Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events. *Chem. Phys. Lipids*, 1994, 73: 91-106
- [40] Lin A.Y., Lunsford J., Bear A.S., Young J.K., Eckels P., Luo L., Foster A.E., Drezek R.A.: High-density sub-100-nm peptide-gold nanoparticle complexes improve vaccine presentation by dendritic cells *in vitro*. *Nanoscale Res. Lett.*, 2013, 8: 72
- [41] Manz R., Assenmacher M., Pflüger E., Miltenyi S., Radbruch A.: Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: 1921-1925
- [42] Marder P., Maciak R.S., Fouts R.L., Baker R.S., Starling J.J.: Selective cloning of hybridoma cells for enhanced immunoglobulin production using flow cytometric cell sorting and automated laser nephelometry. *Cytometry*, 1990, 11: 498-505
- [43] Marx U., Embleton M.J., Fischer R., Gruber F.P., Hansson U., Heuer J., De Leeuw W.A., Logtenberg T., Merz W., Portetelle D., Romette J.L., Straughan D.W.: Monoclonal antibody production. *ATLA*, 1997, 25: 121-137
- [44] Matsuuchi L., Gold M.R., Travis A., Grosschedl R., DeFranco A.L., Kelly R.B.: The membrane IgM-associated proteins MB-1 and Ig- β are sufficient to promote surface expression of a partially functional B-cell antigen receptor in a nonlymphoid cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 3404-3408
- [45] Nagata S., Yamamoto K., Ueno Y., Kurata T., Chiba J.: Preferential generation of monoclonal IgG-producing hybridomas by use of vesicular stomatitis virus-mediated cell fusion. *Hybridoma*, 1991, 10: 369-378
- [46] Ogle B.M., Platt J.L.: The biology of cell fusion: cells of different types and from different species can fuse, potentially transferring disease, repairing tissues and taking part in development. *Am. Scientist*, 2004, 92: 420-427
- [47] Pasqualini R., Arap W.: Hybridoma-free generation of monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101: 257-259
- [48] Pearson T.W., Pinder M., Roelants G.E., Kar S.K., Lundin L.B., Mayor-Withey K.S., Hwett R.S.: Methods for derivation and detection of anti-parasite monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*, 1980, 34: 141-154
- [49] Price P.W., McKinney E.C., Wang Y., Sasser L.E., Kandasamy M.K., Matsuuchi L., Milcarek C., Deal R.B., Culver D.G., Meagher R.B.: Engineered cell surface expression of membrane immunoglobulin as a means to identify monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol. Methods*, 2009, 343: 28-41
- [50] Rawling J., Cano O., Garcin D., Kolakofsky D., Melero J.A.: Recombinant Sendai viruses expressing fusion proteins with two furin cleavage sites mimic the syncytial and receptor-independent infection properties of respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, 2011, 85: 2771-2780
- [51] Seegmiller A.C., Xu Y., McKenna R.W., Karandikar N.J.: Immunophenotypic differentiation between neoplastic plasma cells in mature B-cell lymphoma vs plasma cell myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2007, 127: 176-181
- [52] Sen S., Hu W.S., Srien F.: Flow cytometric study of hybridoma cell culture: correlation between cell surface fluorescence and IgG production rate. *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, 12: 571-576
- [53] Smith S.L.: Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *J. Transpl. Coord.*, 1996, 6: 109-119
- [54] Spieker-Polet H., Sethupathi P., Yam P.C., Knight K.L.: Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: 9348-9352
- [55] Tomita M., Sugi H., Ozawa K., Tsong T.Y., Yoshimura T.: Targeting antigen-specific receptors on B lymphocytes to generate high yields of specific monoclonal antibodies directed against biologically active lower antigenic peptides within presenilin 1. *J. Immunol. Methods*, 2001, 251: 31-43
- [56] Underwood P.A., Bean P.A.: Hazards of the limiting-dilution methods of cloning hybridomas. *J. Immunol. Methods*, 1988, 107: 119-128
- [57] Vienken J., Zimmermann U.: Electric field-induced fusion electro-hydraulic procedure for production of heterocaryon cells in a high yield. *FEBS Lett.*, 1982, 137: 11-13
- [58] Velikovskiy C.A., Cassataro J., Sanchez M., Fossati C.A., Fainboim L., Spitz M.: Single-shot plasmid DNA intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies. Persistent expression of DNA. *J. Immunol. Methods*, 2000, 244: 1-7
- [59] Williams G.B., Weaver J.C., Demain A.L.: Rapid microbial detection and enumeration using gel microdroplets and colorimetric or fluorescence indicator systems. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28: 1002-1008
- [60] Yokoyama W.M., Christensen M., Dos Santos G., Miller D., Ho J., Wu T., Dziegielewski M., Neethling F.A.: Production of monoclonal antibodies. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2013, 102: II:2.5: 2.5.1-2.5.29

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.