

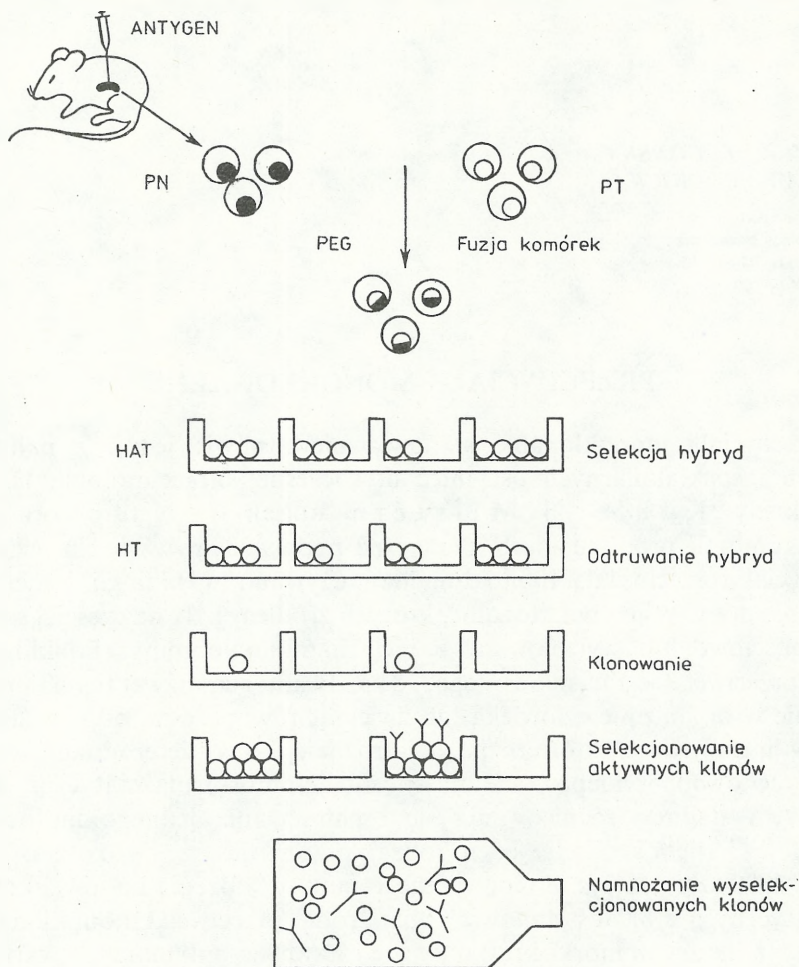
HENRYKA DŁUGOŃSKA
WIESŁAWA RUDNICKA

Katedra Immunologii
Zakład Biologii Infekcyjnej
Instytut Mikrobiologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki
Łódź

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

Przeciwciała monoklonalne stanowią niewątpliwie jedno z najbardziej cennych i spektakularnych osiągnięć nowoczesnej biotechnologii. Do roku 1975, kiedy Köhler i Milstein opisali w „Nature” otrzymanie klonu komórek produkujących identyczne pod każdym względem cząsteczki przeciwciał (przeciwciała monoklonalne), używano w biologii i medycynie wyłącznie przeciwciała poliklonalne, których źródłem były najczęściej surowice odpornościowe lub wyizolowane z nich immunoglobuliny. Poliklonalność takich przeciwciał jest wynikiem tego, że każdy antygen, nawet ten najprostszy, indukuje w organizmie człowieka lub zwierząt równoczesną odpowiedź wielu klonów limfocytów B, które rozpoznają różne epitopy (determinanty swoistości antygenowej), w niepowtarzalny sposób. Komórki plazmatyczne, będące końcowym stadium różnicowania się i namnażania jednego limfocyту B, produkują ściśle określony jeden rodzaj przeciwciał, z szybkością, jak się ocenia, 2000 cząsteczek/s. Z teoretycznego punktu widzenia hodowla komórek plazmatycznych mogłaby stanowić obfite źródło przeciwciał monoklonalnych, ale są to z natury komórki krótko żyjące i nawet w optymalnych warunkach hodowli przeżywają nie dłużej niż 6 tygodni. Köhler i Milstein przełamali to ograniczenie, poddając fuzji naturalne komórki plazmatyczne, pobrane od uodpornionych myszy, z komórkami plazmatycznymi nowotworowymi (myeloma, plasmocytoma). W ten sposób otrzymali komórki hybrydowe (hybrydoma) — mieszańce, które zespoliły dwie najważniejsze cechy obu komórek wyjściowych, tj. zdolność produkowania przeciwciał swoicie reagujących z antygenem, który był użyty do uodporniania (immunizacji) myszy, oraz właściwość namnażania się w sposób nieograniczony w warunkach *in vivo* lub *in vitro*. Od czasu epokowej pracy Köhlera i Milsteina obserwuje się lawinowy rozwój badań nad opracowaniem jak najdoskonalszych technik otrzymywania przeciwciał monoklonalnych — mAb (mAb — monoclonal antibody czyli monoklonalne przeciwciało). Jednak idea pierwotnej metody powyższych autorów oraz schemat pracy pozostały do dziś takie same.

Biotechnologia przeciwciał monoklonalnych obejmuje następujące etapy, które zilustrowano na rys. 1:



Rys. 1. Schemat otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. PN — komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała (Y), PT — komórki plazmatyczne nowotworowe, PEG — glikol polietylenowy, HAT — podłoże z dodatkiem hipoksantyny, aminopteryny i tymidyny, HT — podłoże z dodatkiem hipoksantyny i tymidyny

1. Przygotowanie komórek do fuzji.

a) Uodpornienie zwierząt określonym antygenem w celu wytworzenia komórek plazmatycznych produkujących przeciwciała o pożądanej swoistości w stosunku do antygeny.

b) Dobór linii rakowej plasmocytoma, reklonowanie jej i namnożenie aktywnego klonu.

2. Fuzja komórek *in vitro*.

3. Selekcja hybryd w podłożu HAT (podłoże z dodatkiem hipoksantyny, aminopteryny i tymidyny).

4. Badanie płynów z hodowli na obecność przeciwciał o oczekiwanej swoistości.

5. Odrzuwanie hybryd w podłożu HT (podłoże z dodatkiem tylko hipoksantyny i tymidyny).

6. Klonowanie pozytywnych kultur.

7. Namnażanie aktywnych klonów.

8. Zabezpieczanie uzyskanych klonów przez zamrażanie w ciekłym azocie.

9. Produkcją dużych ilości mAb, *in vitro* lub *in vivo*.

10. Precyzyjne określenie swoistości otrzymanych przeciwciał monoklonalnych.

Proces fuzji poprzedza uodpornienie zwierząt, najczęściej myszy lub szczurów, określonym antygenem. Od osobników, które wyjątkowo dobrze odpowiedziały na dany antygen, czego wskaźnikiem jest wysoki poziom swoistych przeciwciał w pobranej od nich surowicy, izoluje się śledzionę. Jest ona źródłem naturalnych komórek plazmatycznych (PN). W zależności od gatunku i szczepu uodpornianych zwierząt dobiera się odpowiednią linię komórek nowotworowych plazmatycznych PT (T — tumor). Linia ta powinna charakteryzować się następującymi właściwościami:

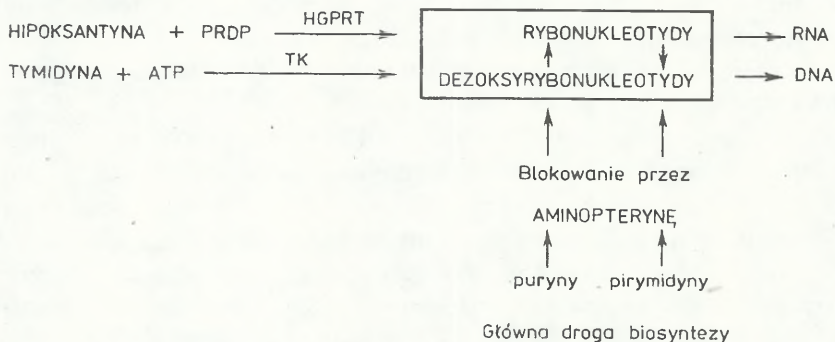
1) wywodzić się z tego samego lub blisko spokrewnionego szczepu i gatunku zwierząt, od którego izoluje się śledzionę,

2) rosnąć w postaci zawiesiny (komórki nieadherentne),

3) mieć krótki okres duplikacji i małe wymagania odżywcze,

4) nie mieć zdolności syntezy nukleotydów na drodze alternatywnej z powodu braku odpowiednich enzymów — HGPRT (fosforybozylotransferaza hipoksantyno-guaninowa) i (lub) TK (kinaza tymidynowa). Mutacje w zakresie tych enzymów uniemożliwiają komórkom wzrost w podłożu z aminopteryną, która blokuje główny szlak syntezy nukleotydów w komórce (rys. 2).

Alternatywna droga biosyntezy



Rys. 2. Dwie drogi syntezy rybonukleotydów i dezoksyrybonukleotydów. PRDP — fosforybozylodwufosforan, ATP — adenozynotrójfosforan, HGPRT — fosforybozylotransferaza hipoksantynowa, TK — kinaza tymidynowa

Fuzję komórek plazmatycznych prawidłowych i nowotworowych przeprowadza się *in vitro* w środowisku czynników zwiększających częstotliwość spontanicznych fuzji komórkowych, najczęściej w środowisku glikolu polietylenowego (PEG) o masie cząsteczkowej 1000–10 000 Da, często z dodatkiem dwumetylosulfotlenku (DMSO). Czynnikiem indukującym zlewanie się komórek może także być pole elektryczne o określonych parametrach.

Wynikiem fuzji komórek są hybrydy homokariotyczne PN/PN i PT/PT, ale również te pożądane hybrydy heterokariotyczne PN/PT. Komórki po fuzji przenosi się do mikropłytek zawierających podłoże HAT w celu selekcji otrzymanych hybryd. Czynnikiem selekcyjnym jest aminopteryna, która jako antagonistka kwasu foliowego hamuje w komórkach główną drogę syntezy kwasów nukleinowych z nukleotydów (rys. 2). Komórki plazmatyczne nowotworowe, jako defektywne mutanty w zakresie HPGRT i (lub) TK, nie mogą wykorzystać obecnych w podłożu hodowlanym hipoksantyny i tymidyny do syntezy kwasów nukleinowych na drodze alternatywnej. Komórki takie po krótkim czasie obumierają. Powolnemu obumieraniu ulegają również komórki śledziony, jako komórki krótko żyjące lub komórki wymagające do rozwoju specjalnych stymulatorów (antygen, interleukiny). Namnażają się natomiast hybrydy heterokariotyczne PN/PT, u których doszło do komplementacji genomów i które po komórkach PT odziedziczyły zdolność nieograniczonego namnażania się, zaś od komórek śledziony uzyskały zdolność syntezy HPGRT i TK. Mikrohodowle komórek poddawanych fuzji ogląda się w mikroskopie inwersyjnym. Wybiera się takie mikrohodowle, w których stwierdza się wzrost hybryd w postaci komórek dużych rozmiarów (7–15 μm), charakterystycznych dla komórek plasmocytoma. Podłoże z wybranych hodowli sprawdza się na obecność przeciwciał reagujących z interesującym, użytym do uodporniania zwierząt antygenem. Hybrydy z pozytywnych mikrohodowli przenosi się do podłoża HT, w którym następuje ich „odtruwanie”, tj. pozbywanie się resztek aminopteryny wewnątrzkomórkowej.

Do sprawdzania obecności przeciwciał w podłożach z hodowli hybryd stosuje się różnorodne metody serologiczne, począwszy od immunodyfuzji, immunoelektroforezy, immunoenzymatycznej sorpcji (ELISA), poprzez test rozetowy aż do metod radioimmunologicznych (RIA).

Dalszy etap w biotechnologii przeciwciał monoklonalnych, to klonowanie otrzymanych hybryd, czyli wyprowadzanie klonów wywodzących się z jednej macierzystej komórki hybrydowej. Stosuje się tu metodę ograniczających rozcieńczeń (cloning by limiting dilution), technikę izolowania kolonii hybryd rozwijających się w miękkim agarze lub metodę izolowania pojedynczych komórek pod mikroskopem z zastosowaniem mikromanipulatorów. Namnażanie hybryd, zwłaszcza na początku, wspomaga się dodatkiem do hodowli komórek „odżywiających” (feeder cells), które produkują czynniki wzrostowe dla hybryd. Dla bezpieczeństwa komórki „odżywiające” napromienia się, aby zapobiec ich proliferacji.

Otrzymywane klony komórkowe różnią się zarówno pod względem stabilności, jak i wydajności w produkcji przeciwciał. W czasie pierwszych podziałów heterokarionów (zwykle między 5 a 20 generacją) następuje często utrata chromosomów, w tym i tych noszących geny kodujące syntezę immunoglobulin. Niektóre klony, mimo reklonowania, nie osiągają nigdy pożądanej stabilności, inne produkują przeciwciała mało wydajnie. Ani jedno ani drugie nie mogą być technologicznie wykorzystane. Natomiast wyselekcjonowane klony poddaje się intensywnemu namnażaniu i zabezpiecza się je przed utratą (np. w skutek zakażenia) przez zamrażanie w ciekłym azocie.

Duże ilości przeciwciał monoklonalnych można otrzymać dwiema metodami:

1. *In vivo*.

Zwierzętom (zwykle myszom lub szczurom) dootrzewnowo wstrzykuje się Pristane (2, 6, 10, 14-*tetra*-metylo-pentadekan) lub niekompletny adiuwant Freunda, a następnie również dootrzewnowo wprowadza się $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ komórek hybrydowych. Powoduje to powstanie nowotworu wysiękowego. Zbierany sukcesywnie otrzewnowy płyn wysiękowy (ascites fluid) stanowi obfite źródło mAb.

2. *In vitro*.

Hybrydy hoduje się w tankach o różnej pojemności (nawet do kilku tysięcy litrów) w podłożach odżywczych, zwykle bez dodatku surowic. Podłoże pohodowlane stanowi materiał do otrzymywania surowego, a następnie oczyszczonego preparatu mAb.

Metoda *in vivo* jest obciążona kilkoma zasadniczymi wadami. Otrzymany płyn wysiękowy, mimo że zawiera dużo monoklonalnych immunoglobulin (nawet do 20 mg w 1 ml), jest zanieczyszczony innymi immunoglobulinami, białkami surowicy, często zainfekowany, sama zaś metoda jest kłopotliwa, mało powtarzalna, a co najistotniejsze — nie można jej stosować u ludzi do produkcji ludzkich mAb. Stężenie przeciwciał w podłożu pohodowlanym w metodzie *in vitro* jest co prawda niższe (do 200 μg w 1 ml), ale wyprodukowane monoklonalne immunoglobuliny można łatwo wyizolować, a surowy produkt odznacza się dużą czystością. Biorąc pod uwagę, że koncentracja mAb w płynie wysiękowym wynosi średnio 5 mg/ml, od jednej myszy można otrzymać średnio 10 ml płynu wysiękowego, a straty podczas oczyszczania wynoszą około 50%, to przygotowanie 1 kg mAb metodą *in vivo* wymaga użycia około 40 000 myszy. Taką samą ilość preparatu można otrzymać z 5000 l hodowli hybryd w podłożach (metoda *in vitro*).

Najtrudniejsze i najbardziej pracochłonne jest precyzyjne określenie swoistości posiadanych mAb, tzn. poznanie epitopów antygenowych, z którymi one reagują. Zazwyczaj mAb o wąskim zakresie swoistości są wyżej cenione niż mAb reagujące z epitopami występującymi w różnych, często zupełnie niepokrewnych substancjach lub organizmach. Charakterystyka mAb wymaga użycia precyzyjnych metod badawczych. Wzór swoistości mAb skierowanych

przeciwko antygenom powierzchniowym komórek często określa się metodą immunofluorescencji, wykorzystując do tego celu cytofluorometrię przepływową. Do ustalenia swoistości mAb przeciwko antygenom rozpuszczalnym wykorzystuje się powszechnie metodę „western-blotting”, w której reakcji z mAb poddaje się dokładnie rozfrakcjonowane antygeny, zaś o obecności powstających swoistych kompleksów antygen–przeciwciała wnioskuje się na podstawie wyników bardzo czułych metod, w których stosuje się przeciwciała znakowane enzymami (metody immunoenzymatyczne).

ZASTOSOWANIE mAb W BADANIACH PODSTAWOWYCH

Trudno przecenić znaczenie monoklonalnych przeciwciał. Stały się one bowiem niezwykle cennym narzędziem badawczym w wielu dziedzinach nauki, nie tylko immunologii czy naukach biologicznych lub medycznych, ale wszędzie tam, gdzie interesująca nas substancja, albo w formie natywnej, albo po jej spreparowaniu, wykazuje właściwości antygenowe.

Przeciwciała monoklonalne pozwalają bardzo precyzyjnie badać znane oraz odkrywać nowe struktury drobnoustrojów (bakterie, wirusy, pasożyty zwierzęce) i poznawać ich rolę czy to w patologii chorób zakaźnych, czy też w procesach życiowych drobnoustrojów wykorzystywanych w praktyce. Precyzję reakcji mAb ze swoistymi epitopami wykorzystuje się do śledzenia zmian antygenowych, jakim ulegają drobnoustroje, zwłaszcza wirusy, np. wirusy grypy. Możliwość uchwycenia tych, często tylko śladowych zmian we właściwościach antygenowych wirusów, jest niezwykle przydatna w badaniach epidemiologicznych. Pozwala bowiem szybko identyfikować wirusy pojawiające się na danym terenie i podejmować odpowiednią akcję profilaktyczną, łącznie z szybką produkcją szczepionki, która byłaby skuteczna przeciwko nowej formie antygenowej wirusa. Jest to konieczne, gdyż często szczepionka przygotowana przeciwko wirusowi np. grypy, który był powodem wcześniejszej epidemii, nie chroni przed zachorowaniem wywołanym wirusami będącymi przyczyną świeżo obserwowanej epidemii, ze względu na zmienione właściwości antygenowe wirusów.

Wprowadzenie techniki mAb, pozwoliło wykryć charakterystyczne antygeny różnorodnych komórek, co stało się podstawą wyróżnienia subpopulacji wielu komórek różnorodnych organizmów wyższych. Szczególny postęp osiągnięto w poznaniu komórek immunologicznie czynnych, zwłaszcza limfocytów. Morfologicznie nierozróżnialne limfocyty okazały się zbiorem wielu subpopulacji, o często przeciwstawnych funkcjach (np. limfocyty grasiczozależne pomocnicze — CD4, reagujące ze zbiorem mAb rozpoznających epitopy antygeny T4, lub limfocyty grasiczozależne supresorowe — CD8, wiążące inny zbiór mAb rozpoznających epitopy antygeny T8). Dało to nie dającą się przecenić szansę badania i lepszego zrozumienia skomplikowanych procesów odporności.

ciowych. Bliższa znajomość antygenów komórek prawidłowych pozwala z kolei odróżniać antygeny komórek nowotworowych.

Przeciwciała monoklonalne okazały się również bardzo cennym narzędziem do badania czynnych biologicznie substancji, nieodzownych dla utrzymania równowagi wewnątrzustrojowej, a występujących tylko w śladowych ilościach, takich jak limfokiny (interleukiny, interferony, czynnik martwicy nowotworów (TNF) czy hormony. Uzyskuje się również różnorodne mAb przeciwko receptorom wiążącym biologicznie czynne substancje, co pozwala nie tylko poznać mechanizm ich działania, ale również śledzić dynamikę mediowanych przez nie reakcji.

Wreszcie mAb w ważki sposób przyczyniły się do lepszego poznania różnorodności przeciwciał, jako białek immunoglobulinowych, genetycznego podłoża tej różnorodności oraz pełniejszego zrozumienia istoty reakcji antygen – przeciwciało.

ZASTOSOWANIE mAb W DIAGNOSTYCE

Lawinowa i ciągle rosnąca produkcja mAb spowodowana jest głównie zapotrzebowaniem na nie w diagnostyce laboratoryjnej. Dają one szansę szybkiego określania przynależności gatunkowej, a nawet szczepowej drobnoustrojów izolowanych od chorych lub z różnego rodzaju produktów, np. z żywności. Ustalenia takie są bardzo ważne z punktu widzenia epidemiologii i konieczne do kontroli źródeł zakażenia drobnoustrojami, zasięgu patogenów i dróg szerzenia się zakażeń, a także oceny podatności populacji na danym terenie epidemiologicznym. Precyzyjne i szybkie ustalenie przynależności gatunkowej drobnoustrojów jest również ważne dla wyboru właściwego sposobu leczenia. Pewne drobnoustroje, należące do odległych grup taksonomicznych, mają wspólne determinanty antygenowe, co uniemożliwia lub utrudnia ich identyfikację z użyciem przeciwciał poliklonalnych. Jednak zastosowanie mAb o wąskiej swoistości pozwala odróżnić od siebie takie drobnoustroje. Przykładem mogą być zakażenia układu moczopłciowego wywoływane przez dwoinki rzeżączki (*Neisseria gonorrhoeae*) lub *Chlamydia trachomatis*. Objawy choroby w obu przypadkach są podobne. Choroba przenosi się głównie przez kontakt seksualny. Wymienione bakterie mają wspólne determinanty antygenowe i wobec tego reagują krzyżowo z przeciwciałami poliklonalnymi przeciwko *Chlamydia trachomatis* lub przeciwko *Neisseria gonorrhoeae*. Jednak leczenie tych dwóch różnych zakażeń wymaga użycia odmiennych antybiotyków. Należy jednak zaznaczyć, iż otrzymanie dobrych mAb do szybkiej diagnostyki chorób zakaźnych nie jest łatwe. Przeciwciała takie muszą być swoiste gatunkowo lub szczepowo, jednak w obębie gatunku lub szczepu drobnoustroju powinny one reagować z maksymalną częstotliwością.

Inne zastosowanie diagnostyczne mAb, to możliwość rozpoznawania i klasyfikowania niedoborów odpornościowych w zakresie różnorodnych

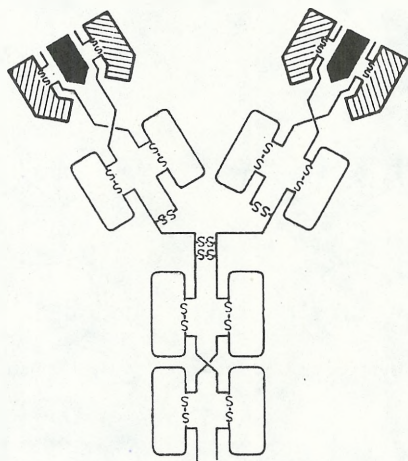
subpopulacji komórkowych, np. wykazywanie przewagi liczebnej limfocytów grasiczozależnych supresorowych nad limfocytami grasiczozależnymi pomocniczymi u chorych na AIDS. Przeciwciała monoklonalne są również nie dającym się zastąpić narzędziem w wykrywaniu nieprawidłowości w produkcji, uwalnianiu lub stabilności regulatorów procesów fizjologicznych, np. limfokin, hormonów czy różnorodnych pośredników w procesach fizjologicznych. Warto tutaj zaznaczyć, iż dopiero wprowadzenie do badań rutynowych przeciwciał monoklonalnych pozwoliło uniknąć reakcji nieswoistych i zwiększyć wiarygodność oznaczeń takich substancji. Podobnie zastosowanie mAb w typowaniu tkankowym, tzn. oznaczaniu antygenów zgodności tkankowej, umożliwia lepsze przewidywanie i unikanie reakcji biorców na obce dla nich antygeny zawarte w przeszczepionych komórkach, tkankach czy organach i tym samym stwarza lepsze perspektywy w transplantologii. Coraz częściej sięga się również po mAb przeciwko antygenom grupowym krwinek czerwonych, np. antygenom układu ABO podczas ustalania grup krwi, szczególnie u wielokrotnych biorców preparatów krwiopochodnych. Wreszcie ogromne znaczenie i duża nadzieja, to możliwość wczesnego diagnozowania komórek nowotworowych przy użyciu mAb przeciwko antygenom nowotworowym lub antygenom, których stężenie wzrasta podczas procesu nowotworzenia.

ZASTOSOWANIE mAb W TERAPII

Zastosowanie mAb w leczeniu ludzi lub zwierząt może polegać na podawaniu natywnych lub zmodyfikowanych cząsteczek immunoglobulin w celu niszczenia komórek nowotworowych lub czynników infekcyjnych lub na wykorzystaniu mAb, jako nośników substancji aktywnych terapeutycznie.

Na podstawie badań zwierząt eksperymentalnie zakażanych można sądzić, iż mAb w bardziej precyzyjny i bardziej skuteczny sposób niż przeciwciała poliklonalne mogą unieczynniać drobnoustroje rozwijające się w organizmie. Czynniki warunkującymi protekcyjne działanie mAb będzie ich swoistość ukierunkowana na struktury decydujące o patogenności drobnoustroju lub jego możliwości namnażania się w żywym organizmie, a także klasa lub subklasa przeciwciał, determinująca ich właściwości biologiczne. Przeciwciała monoklonalne o odpowiednich parametrach będą niszczyć drobnoustroje bezpośrednio, neutralizować produkowane przez nie toksyny lub wiążąc się z antygenami powierzchniowymi drobnoustrojów, czynić je bardziej podatne na pochłanianie i niszczenie przez fagocyty lub na lityczne działanie dopełniacza. Ponadto komórki, zakażone przez drobnoustroje, w których dochodzi do ekspresji antygenów takich drobnoustrojów (dotyczy szczególnie niektórych wirusów), mogą być niszczone w bezpośrednich reakcjach cytotoksycznych przez wyspecjalizowane komórki cytotoksyczne.

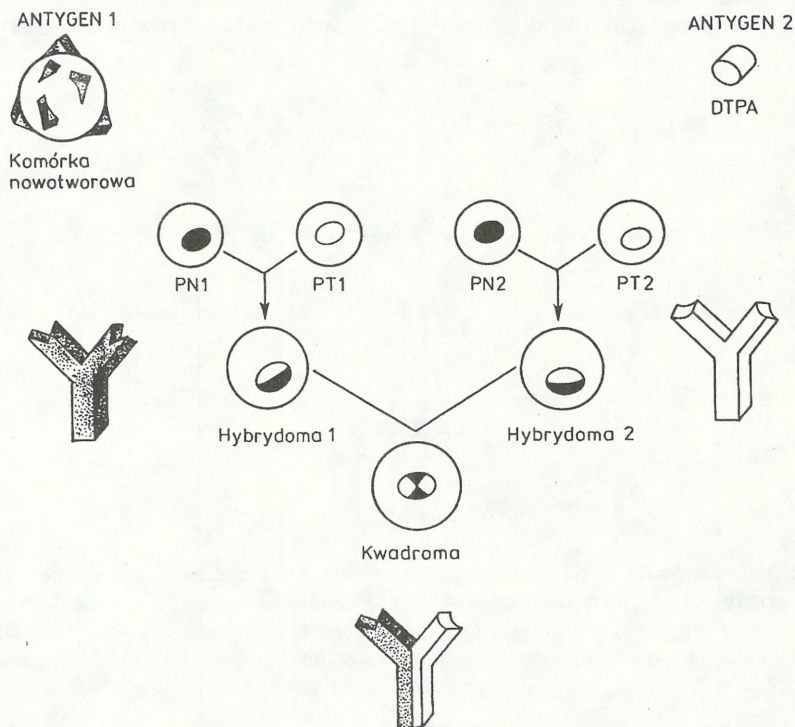
Duże nadzieje pokładane są w możliwości wykorzystania mAb, jako nośników leków. Dzięki wysokiej swoistości przeciwciał monoklonalnych, lek może docierać wyłącznie do komórek objętych procesem chorobowym, np. komórek nowotworowych lub zmienionych w procesach autoimmunologicznych. Szczególną nadzieję z tą metodą leczenia wiązą onkolodzy. Swoiste przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenowi charakterystycz-



Rys. 3. Schemat cząsteczki przeciwciała rekombinacyjnego, chimerycznego, otrzymanego techniką inżynierii genetycznej. Obszary o zmiennej sekwencji aminokwasów (zakreskowane), zawierające miejsca wiązania antygeny, pochodzą z mysiego przeciwciała monoklonalnego. Pozostała część cząsteczki to domeny o stałej sekwencji aminokwasów immunoglobuliny ludzkiej. Zaczernione pole przedstawia antygen

nemu dla danego nowotworu, sprzężone z cytostatykiem (np. methotrexat), toksyną roślinną (rycyna A) lub izotopem promieniotwórczym, wiążą się z komórkami nowotworowymi, a wprowadzony lek wybiórczo je niszczy. Wysoka masa cząsteczkowa (150 kDa) immunoglobulin powoduje jednak, że tylko niewielka porcja wprowadzanych dożylnie przeciwciał, tj. średnio 0,1%–0,6%, łączy się z antygenami nowotworu. Ponadto, ze względu na trudności w otrzymywaniu ludzkich mAb, stosuje się najczęściej przeciwciała mysie lub szczurze. Wprowadzanie ich ludziom wzbudza odpowiedź immunologiczną na obce białko, a produkowane podczas tej odpowiedzi przeciwciała przeciwko immunoglobulinom mysim lub szczurzym powodują szybką eliminację leku z organizmu, uniemożliwiając jego dłuższe stosowanie. Dlatego zainteresowanie budzi możliwość użycia w terapii przeciwciał rekombinacyjnych (rys. 3). Przeciwciała takie są immunoglobulinami ludzkimi, do których technikami DNA wprowadzono obszary zmienne np. mysich przeciwciał monoklonalnych. Takie chimeryczne (humanizowane) przeciwciało reaguje z takimi samymi determinantami antygenowymi, jak wyjściowe przeciwciało

monoklonalne mysie, ale sama cząsteczka, w przeważającej części, jest białkiem ludzkim. Zabieg taki pozwala zredukować immunogenność nośnika i powstawanie przeciwciał przeciwko nośnikowi, jakkolwiek nie eliminuje całkowicie tego niekorzystnego zjawiska.



Rys. 4. Schemat przedstawiający otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych o podwójnej swoistości metodą fuzji dwu linii hybrydowych

Bardzo obiecujące są też wyniki badań przeciwciał monoklonalnych o podwójnej swoistości, które można otrzymać techniką somatycznej fuzji dwóch linii hybrydowych, z których każda produkuje immunoglobuliny monoklonalne o innej swoistości np. w stosunku do antygeny charakterystycznego dla danych komórek nowotworowych oraz dla jakiegoś niskocząsteczkowego związku, np. DTPA (kwas 2-etyleno-3-amino-5-octowy) (rys. 4). Wyselekcjonowane przeciwciała dwuswoiste, po wprowadzeniu do organizmu, łączą się jednym miejscem wiązania antygeny ze strukturami obecnymi na komórkach nowotworowych. Nie związane z komórkami przeciwciała są usuwane z organizmu w ciągu kilku dni. Wówczas wstrzykuje się do organizmu DTPA związany z radioaktywnym itrem (^{90}I -DTPA). Związek ten łączy się z drugim miejscem wiążącym antygen w cząsteczkach przeciwciał obecnych na powierzchni komórek nowotworowych. Promieniowanie emitowane przez radioaktywny itr niszczy komórkę nowotworową, z którą związane jest dwuswoiste

przeciwciało, a także sąsiadujące komórki guza. Nadmiar ^{90}I -DTPA usuwany jest z organizmu w ciągu kilku minut. Opisana technika, którą można określić jako immunoterapię dwustopniową (faza lokalizacji i faza toksyczna), stanie się być może podstawą nowoczesnego leczenia nowotworów, jakkolwiek trudność w jej stosowaniu stanowi ciągle słabo poznana natura antygenów nowotworowych.

Zapotrzebowanie współczesnej medycyny na oczyszczone preparaty czynne biologicznie mogą być również realizowane przy użyciu mAb. Zastosowanie adsorbentów sprzężonych z wysokoswoistymi przeciwciałami monoklonalnymi (np. przeciwko interferonom, interleukinom) umożliwia izolowanie takich substancji z wieloskładnikowych źródeł, np. z krwi czy homogenatów tkankowych.

Technika przeciwciał monoklonalnych Köhlera i Milsteina zrewolucjonizowała współczesną wiedzę teoretyczną i praktyczną, a szeroki zakres ich zastosowania sprawił, że produkcja przeciwciał monoklonalnych stanowi jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się gałęzi biotechnologii.

HENRYKA DŁUGOŃSKA, WIESŁAWA RUDNICKA

MONOCLONAL ANTIBODIES

Summary

The development of methods for generation of monoclonal antibodies by Köhler and Milstein made it possible to produce large quantities of homogenous populations of antibody molecules with the same precise specificity for a given antigenic determinant. The principles of biotechnology for the monoclonal antibody production including the generation and selection of hybridomas are presented. The second part of the paper concerns the application of monoclonal antibodies in science and in medical diagnosing. The perspective of monoclonal antibodies in immunotherapy is also discussed.

LITERATURA

1. Beverley P. C. L., Riethmüller G. — *Immunological intervention with monoclonal antibodies*. Immunology today. 8: 101–102, 1987.
2. Bręborowicz I., Gan J. — *Reaction of monoclonal antibodies with human AFP in affinity electrophoresis*. Immunologia Polska XI: 11–21, 1986.
3. Brüggemann M., Williams G. T., Cashey H. M., Teale C., Spicer C., Surrant M. A., Neuberger M. S. — Construction, function and immunogenicity of recombinant monoclonal antibodies. Behring Inst. Mitt. 87: 21–24, 1990.
4. Długońska H. — *Technika otrzymywania przeciwciał monoklonalnych*. Wiad. Parazytol. XXX: 649–658, 1984.
5. Götze D. — *Somatische Zell-Hybridisierung-Methoden und Anwendungen*. Immunforschung in Klinik und Labor. Sonderheft. 5–36, 1979.

6. Knapp W., Rieber B., Dörken B., Schmidt R. E., Stein H., v.d Borne A. E. G. Kr. — *Towards a better definition of human leucocyte surface antigens. Immunology today.* 10: 235–261, 1989.
7. Köhler G., Milstein C. — *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature. 256: 495–497, 1975.
8. Mach J.-P., Pelegri A., Buchegger F. — *Imaging and therapy with monoclonal antibodies in non-hematopoietic tumors.* Curr. Opinion in Immunol. 3: 685–693, 1991.
9. Male D., Champion B., Cooke A. — *Advanced Immunology.* I. B. Lippincott Company. Philadelphia. 9.1–9–12, 1987.
10. McCulloch K. C., Spier R. E. — *Monoclonal antibodies in biology and biotechnology: theoretical and practical aspects.* Cambridge University Press. Cambridge. 265–315, 316–351, 1990.
11. McKear J. P., Henson G. — *Mapping of novel B lymphocyte differentiation antigens.* Immunological Methods. Acad. Press. Inc. Orlando, 147–162, 1985.
12. Munro Neville A. — *Detection of tumor antigens with monoclonal antibodies: immunopathology and immunodiagnosis.* Curr. Opinion in Immunol. 3: 674–678, 1991.
13. Nicholson K. A., Iones B. M. — *Immunotyping by flow cytometry: its use in HIV infection.* Inter. Laboratory. April/May, 21–26, 1989.
14. Nowinski R. C., Tam M. R., Goldstein L. C., Stong L., Cho-Chou Kuo, Korey L., Stamm W. E., Handsfield H. H., Knapp I. S., Holmes K. K. — *Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans.* Science 219: 673–644, 1983.
15. Oi V. T., Herzenberg L. A. — *Immunoglobulin producing cell lines. Selected methods in cellular immunology.* (red. Mishell B. B., Shiigi S. M., Freeman W. H. and Co.). San Francisco. 351–372, 1980.
16. Olsnes S., Sandvig F., Petersen O. W., van Ders Bo. — *Immunotoxins — entry into cells and mechanisms of action.* Immunology today 10: 291–295, 1989.
17. Roitt I. — *Essential immunology.* Blackwell Scientific Publ. London 107–110, 114–115, 144–145, 228, 1988.
18. Rytwiński K. — *Cytotoksyczne działanie przeciwciała monoklonalnego 791/36 związanego z łańcuchem A rycyny na komórki linii ludzkiego osteosarcoma.* Immunologia Polska XII, 137–146, 1987.
19. Scheinberg D. A. — *Current applications of monoclonal antibodies for the therapy of hematopoietic cancers.* Curr. Opinion in Immunol. 3: 679–684, 1991.
20. Seemann G., Bosslet K., Sedlacek H.-H. — *Recombinant monoclonal antibodies in tumor therapy.* Behring Inst. Mitt. 87: 33–47, 1990.
21. Sikora I., Szczyrzyca H., Żeromski J. — *Ocena reaktywności przeciwciał monoklonalnych przeciw wybranym markerom nowotworowym z komórkami nowotworowymi płuc chorych na raka płuca.* Immunologia Polska XII: 35–42, 1987.