

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENA MARTINČIČ

**PROUČEVANJE TERMIČNE STABILNOSTI MONOKLONSKIH
PROTITELES V KRVNOSKUPINSKEM SISTEMU AB0**

**THERMOSTABILITY STUDIES OF MONOCLONAL ANTIBODIES
IN BLOODGROUP SYSTEM AB0**

Ljubljana, 2009

Diplomsko naložbo sem v celoti izdelala na Centru za razvoj in izdelavo diagnostičnih reagentov Zavoda RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja, mag. farm. in somentorice dr. Katrine Hartman-Pretnar, mag. farm.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorju prof. dr. Borutu Štruklu ter vsem zaposlenim s Centra za razvoj in izdelavo diagnostičnih reagentov, ki so me ves čas nastajanja moje naloge spremljali, mi pomagali in bili na voljo za kakršnakoli vprašanja.

Še posebej se zahvaljujem prof. dr. Vladki Čurin-Šerbec, ki mi je omogočila opravljanje diplome na ZTM ter somentorici dr. Katrini Pretnar-Hartman za vse strokovne nasvete in pomoč pri pisanju. Hvala tudi Boštjanu Smrekarju, ki me je naučil spremnosti dela v laboratoriju in mi ves čas stal ob strani.

Še enkrat vsem najlepša hvala, veliko sem se naučila od vas!

Na koncu bi se rada zahvalila tudi mojim najbližnjim, ki so me ves čas šolanja podpirali, vzpodbujali, pomagali in verjeli vame kljub mojim spodrsljajem.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Boruta Štruklja, mag. farm. in somentorice dr. Katrine Pretnar-Hartman, mag. farm.

KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1. ODKRITJE KRVNOSKUPINSKEGA SISTEMA AB0	1
1.1.1. Biokemijsko in genetsko ozadje antigenov	2
1.1.2. Zgradba oligosaharidnih verig.....	3
1.1.3. Vloga glikoziltransferaz pri nastanku antigenov AB(H)	4
1.2. PROTITELESA	5
1.2.1. Zgradba protiteles	6
1.2.1.1. Antigeneske determinante	7
1.2.1.2. Vezišče za antigen	8
1.2.2. Strukturne značilnosti posameznih razredov protiteles	8
1.2.3. Reagenti za določanje krvnih skupin	10
1.3. STABILNOST	10
1.3.1. Testiranje stabilnosti	11
1.3.2. Stabilnost proteinov.....	11
1.3.3. Stabilnost protiteles.....	12
1.4. METODA AGLUTINACIJE	14
1.4.1. Dejavniki, ki vplivajo na prvo stopnjo (sensibilizacijo)	15
1.4.2. Dejavniki, ki vplivajo na drugo stopnjo (aglutinacijo).....	16
1.4.3. Ostali dejavniki	17
2. NAMEN DELA	18
3. MATERIALI IN METODE.....	19
3.1. MATERIALI	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Priprava, zamrzovanje in odmrzovanje eritrocitov	20
3.2.2. Priprava gojišča	21
3.2.3. Odmrzovanje in gojenje mišjih hibridomskih celic	21
3.2.4. Štetje celic	22
3.2.5. Zamrzovanje celic	22
3.2.6. Pospešeno staranje	23
3.2.7. Test staranja supernatantov pri +55 °C	23
3.2.8. Določanje titra protiteles	24
3.2.9. Avidnost protiteles.....	25
3.2.10. Iskanje temperaturne točke stabilnosti	25
3.2.11. Kloniranje celične linije s protitelesi 21B11	26
3.2.12. Postopek ELISA	27
3.2.12.1. Posredni postopek ELISA	27
3.2.12.2. Metoda »Sendvič ELISA«	28
4. REZULTATI.....	29
4.1. POSPEŠENO STARANJE PRIPRAVLJENIH SUPERNATANTOV.....	29
4.1.1. Titer	29
4.1.2. Čas aglutinacije	34
4.1.3. Pospešeno staranje izbranih supernatantov	36
4.2. STARANJE SUPERNATANTOV PRI +55 °C.....	40
4.2.1. Titer	40
4.2.2. Čas aglutinacije	45
4.2.3. Staranje izbranih supernatantov pri +55 °C	47

4.3. TEMPERATURNATA TOČKA STABILNOSTI.....	51
4.4. KLONI CELIČNE LINIJE Z MABS 21B11	55
4.4.1. Titer.....	55
4.4.2. Čas aglutinacije.....	57
4.5. POSREDNI POSTOPEK ELISA.....	58
4.6. METODA »SENDVIČ ELISA«.....	61
5. RAZPRAVA	63
6. SKLEP	70
7. LITERATURA.....	71

POVZETEK

Ko so v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja odkrili postopek priprave nesmrtnih celičnih linij, so tudi v transfuzijski medicini pri določanju krvnih skupin z metodo aglutinacije poliklonske reagente zamenjali z monoklonskimi. Od tedaj vse tehnike temeljijo na monoklonskih protitelesih.

Ker napačna določitev krvne skupine pri transfuziji lahko vodi do zapletov, morajo biti reagenti specifični, visoko afinitetni in termostabilni. Za zagotavljanje teh karakteristik je zelo pomemben način shranjevanja in rok uporabnosti, zato so bili supernatanti podvrženi ustreznim testiranjem.

Testirali smo termično stabilnost pri ostrejših pogojih kot jih za pospešeno testiranje predvidevajo ICH smernice in ugotovili, da so testirana protitelesa dobro prestala večkratno izmenično zamrzovanje in segrevanje. Iz rezultatov lahko sklepamo, da bi lahko bili reagenti stabilni dve leti, če jih shranjujemo pri temperaturi od +2 do +8 °C. Poleg tega smo ugotovili, da je bila večina protiteles termostabilna pri temperaturi +55 °C vsaj 24 ur.

Z imunokemijsko metodo ELISA smo določili še relativno vsebnost in koncentracijo monoklonskih protiteles.

ABSTRACT

In 1975 Kohler and Milstein have discovered the way of preparing immortal cell lines, which produce monoclonal antibodies. After introduction of monoclonal antibodies the use of polyclonal serums decreased. Now all blood group typing is based on agglutination with monoclonal reagents.

To establish good storage conditions and to estimate shelf-lives, the stability of each component of the assay should be investigated. Reagent stability is normally accessed by subjecting them to accelerated decay at elevated temperatures.

It is also important to determine some characteristics of reagents such as specificity, high temperature stability and titer that reflect potency of monoclonal antibodies in the reagent. Reagents were carried out under more severe conditions than those described in ICH guidelines for accelerated testing. After testing we found out that monoclonal antibodies passed the repeatedly process of freezing and thawing and the shelf-life of reagents could be two years at storage conditions from +2 to +8 °C.

All reagents, except two, were carried over the temperature +55 °C at least 24 hours.

Following we determined concentration and relative amount of monoclonal antibodies in testing supernatants. All these results were established by immunochemical method ELISA.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab/Abs – protitelo/protitelesa

Ag – antigen/antigeni

Anti-A – protitelesa a-A

Anti-B – protitelesa a-B

Erci – eritrocit/eritrociti

Fab – variabilna regija, vezavno mesto za antigen

Fc – konstantna regija

Fuc – fukoza

Gal – galaktoza

GalNAc – *N*-acetilgalaktozamiltransferaza

Glc – glukoza

GlcNAc – *N*-acetilglukozamiltransferaza

GLP – dobra laboratorijska praksa

GMP - dobra proizvodna praksa

ICH - International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use

Ig – imunoglobulin

L-Glu – L-glutamin

mAb/mAbs – monoklonsko protitelo/monoklonska protitelesa

MPL – mikrotitrská ploščica

rcf – relativna centrifugalna sila

S-S – disulfidna vez

SN – supernatant, ki vsebuje mAbs

Tg – temperatura steklastega prehoda

V_H – variabilna regija na težki verigi

V_L – variabilna regija na lahki verigi

WHO – Svetovna zdravstvena organizacija

ZTM – Zavod RS za transfuzijsko medicino

1. UVOD

1.1. ODKRITJE KRVNOSKUPINSKEGA SISTEMA AB0

Krvnoskupinski sistem AB0 je leta 1900 odkril Karl Landsteiner, ko je navzkrižno pomešal suspenzije eritrocitov (Erci) ter serume svojih sodelavcev. Do aglutinacije je prišlo le pri nekaterih kombinacijah in glede na to je vzorce krvi razvrstil v tri krvne skupine: A, B in 0. Decastello in Sturli pa sta leta 1902 odkrila še krvno skupino AB (1).

Landsteiner je ugotovil, da je prisotnost ozziroma odsotnost le dveh antigenov (Ag) A in B dovolj zadostna za razlago krvnih skupin A, B, AB in 0. Prav tako je ugotovil, da vsebuje serum posameznika protitelesa (Abs) proti Ag, ki jih nima na lastnih Erci. Ker se krvne skupine dedujejo, je hkrati dokazal, da ima oseba s krvno skupino A gena *A* in 0 ali samo *A*, oseba s krvno skupino B gena *B* in 0 ali samo *B*, oseba s krvno skupino AB pa gena *A* in *B*. Oseba s krvno skupino 0 ima dva gena 0, nima pa genov *A* in *B*. Gen *A* kodira glikoziltransferazo A, gen *B* pa glikoziltransferazo B. (2)

Tabela I: Krvne skupine sistema AB0.

MOŽNI GENOTIPI	ANTIGENI NA ERITROCITIH	KRVNA SKUPINA	PROTITELESA V SERUMU
<i>AA, A0</i>	A	A	Anti-B
<i>BB, B0</i>	B	B	Anti-A
<i>AB</i>	AB	A,B	/
<i>00</i>	/	0	Anti-A, anti-B

Poleg krvnoskupinskega sistema AB0 danes poznamo še tri Ag sisteme na Erci, ki so prav tako izključno ogljkovi hidrati. To so sistemi P, Lewis in H. Tudi nastanek teh Ag omogočajo encimi glikoziltransferaze. (2)

Kljub kasnejšim odkritjem drugih krvnih skupin je krvnoskupinski sistem AB0 še danes eden najbolj pomembnih v transfuzijski medicini. To je tudi edini sistem, kjer so v serumu zdravih ljudi prisotna naravna Abs, ki se razvijejo v prvih šestih mesecih verjetno zaradi stika z Ag podobnimi imunodominantnimi sladkorji v celični steni bakterij in nekaterih rastlin. Prav zato je ugotavljanje skladnosti med prejemnikom in dajalcem osnova vseh

predtransfuzijskih preiskav, saj so posledice, kot so akutna hemoliza in zavrnitvene reakcije, lahko usodne. (1)

Za rutinsko določanje krvih skupin se še vedno v veliki meri uporablja metoda aglutinacije. Ta je zelo preprosta, hitra in daje zanesljive rezultate.

Sredi devetdesetih let prejšnjega stoletja se je na trgu pojavil nov način ugotavljanja aglutinacije, ki omogoča avtomatizacijo in s tem tudi izključuje subjektivno odčitavanje rezultatov. Tako imenovano aglutinacijo v gelu je razvil Y. Lapierre leta 1984 in postopek tudi patentiral. (3)

Aglutinacija v gelu je hiter, preprost in enostaven, hkrati pa specifičen in zanesljiv test. Danes to metodo uporabljajo ne le za določanje Ag krvnoskupinskega sistema AB0, temveč za večino Ag, ki jih najdemo na površini Erci. (2)

Metodo so razvili in optimirali s poliklonskimi Abs, saj so bila ta takrat najbolj uporabljana, kasneje pa so jih zamenjala monoklonska Abs (mAbs). (2)

1.1.1. Biokemijsko in genetsko ozadje antigenov

Med Ag krvnoskupinskega sistema AB0 spadata A in B, Ag H pa je pomemben zato, ker je prekurzor Ag A in B in je tako nujen za nastanek krvnih skupin A, B in AB. (2)

Večina Ag AB0 na Erci je vezanih na transmembranske proteine (približno 80 %) ter na proteine, ki prenašajo glukozo. (1)

Ostalih 20 % Ag AB0 so našli na glikosfingolipidih, kjer so oligosaharidne verige preko glukoze vezane na ceramidni preostanek. Glikosfingolipidi so integralni del membrane Erci, epitelnih ter endotelnih celic. (1)

Razlike v antigenosti Ag AB0, vezanimi bodisi na proteine oziroma na lipide, niso poznane, medtem ko obstajajo razlike v antigenosti znotraj samih oligosaharidnih verig. Dva glavna vira razlik v antigenosti sta struktura jedra in razvejanost oligosaharidne verige. (2)

Na membranah Erci se nahajajo polisaharidni Ag kot posledica delovanja encima glikoziltransferaze. Njegova funkcija je, da katalizira prenos določenega sladkorja iz nukleotid sladkornega donorja na specifični substratni receptor. Izražanje posamezne glikoziltransferaze in s tem prisotnost določenih Ag določajo geni treh ločenih lokusov

AB0, *Hh* in *Sese*. Poglavitni aleli lokusa *AB0* se nahajajo na kromosomu 9, genska lokusa *Hh* in *Sese* pa na kromosomu 19. Na vsakem lokusu sta prisotna 2 alela, funkcionalna (*H* in *Se*) ali amorfna (*h* in *se*). (4)

Gen *0* je nefunkcionalen in se deduje recessivno, gena *A* in *B* pa kodominantno. Glede na to poznamo 4 osnovne krvne skupine (tabela I). Gen *H* kodira glikoziltransferazo H, ki katalizira nastanek oligosaharida H, ta pa je osnova za nadaljnjo tvorbo Ag A in B. Gen *H* je prisoten pri večini ljudi, razen pri osebah z genotipom *hh* – krvna skupina Bombay (0_h) – slednji na Erci nimajo Ag A oz. B, kljub prisotnosti gena *A* in *B*. Osebe z genotipom *sese* pa niso sekretorji in v njihovih telesnih tekočinah ni krvnoskupinskih Ag AB0. (4)

1.1.2. Zgradba oligosaharidnih verig

Notranje jedro oligosaharidnih verig, od mesta glikozilacije do nekaj zadnjih sladkorjev v oligosaharidni verigi, predstavlja preprosta struktura ogljikovih hidratov, ki so povezani v razvejano strukturo (5). Predpostavlja, da so razlike v zgradbi notranjega jedra vzrok razlik v reakciji med Ag na Erci otrok ter Erci odraslih. Na Erci dojenčkov naj bi bili prisotni pretežno Ag A, B in H kot linearni oligosaharidi, medtem ko imajo Erci odraslih oseb visok delež razvejanih oligosaharidov z večjim številom mest, kjer encimi glikoziltransferaze lahko dodajajo Ag A, B in H (6).

Poleg razlik v zgradbi notranjega jedra obstajajo tudi razlike v zgradbi t.i. zunanjega jedra, ki ga predstavlja zadnji disaharid v oligosaharidni verigi in deluje kot substrat različnim glikoziltransferazam, ki končujejo proces podaljševanja oligosaharidne verige (7).

Poznamo 5 tipov (tipi 1-4 in 6) prekurzorskih verig zunanjega jedra:

Tip 1: Galβ1-3GlcNAcβ-

Tip 2: Galβ1-4GlcNAcβ-

Tip 3: Galβ1-3GalNAcα-

Tip 4: Galβ1-3GalNAcβ-

Tip 6: Galβ1-4Glc-

Prekurzorske verige tipa 1 najdemo v epitelnem tkivu, telesnih tekočinah in izločkih. (1)

Prekurzorske verige tipa 2 so poglavite strukture na Erci ter celicah kože, najdemo pa jih tudi v tkivu, kjer se izražajo prekurzorske verige tipa 1. (1)

O glikoproteinih s prekurzorsko verigo tipa 3 je le malo znanega. Te strukture so izolirali iz sluzi ovarijskih cist in želodčne sluzi, ne najdemo pa jih na Erci. Vezane so izključno na lipide. (1)

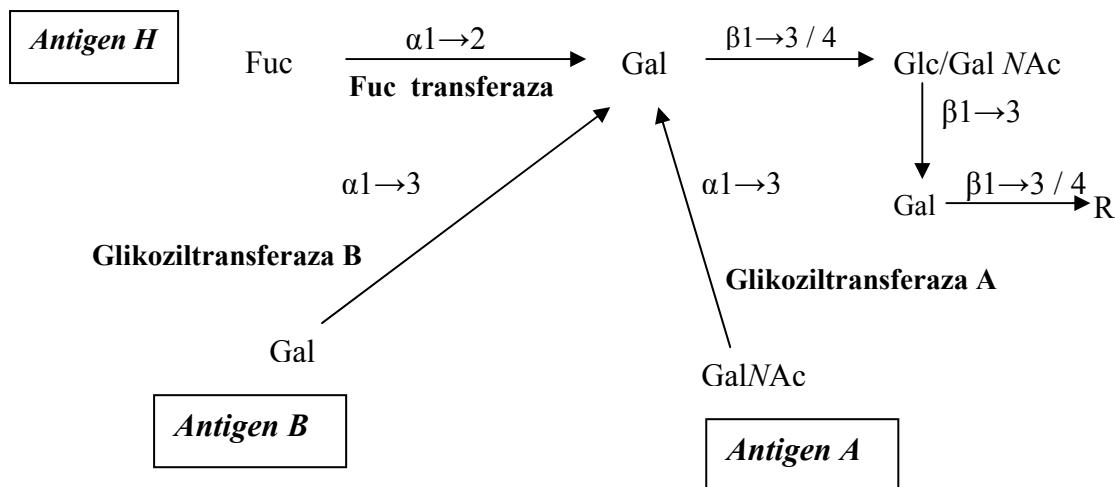
Prekurzorske verige tipa 4 se nahajajo na celicah v ledvicah, medtem ko predstavljajo na eritrocith le majhen delež. Najdemo jih na glikolipidih. (1)

O prekurzorskih verigah tipa 6, ki so jih našli v mleku in slini, še ne vedo veliko(1).

Prekurzorske verige tipa 5 pa niso naravno prisotne, ampak so jih sintetizirali (2).

1.1.3. Vloga glikoziltransferaz pri nastanku antigenov AB(H)

Glikoziltransferaze se kot membranski proteini nahajajo v endoplazmatskem retikulumu in v Golgijevem aparatu. Nastanejo s proteolitično cepitvijo območja med katalitsko in transmembransko domeno. Vse glikoziltransferaze so sestavljene iz N-terminalne kratke domene, transmembranskega hidrofobnega dela ter dolge C-terminalne domene, ki po vsej verjetnosti vsebuje katalitsko mesto encimov. (2)



Slika 1: Shema nastanka antigenov A in B iz osnovnega antigena H.

Nastanek Ag H katalizirata najmanj dve različni α -2-fukoziltransferazi (Fuc transferaza), ki dodajata fukozo (Fuc) preko $\alpha(1\rightarrow 2)$ vezi na končno galaktozo (Gal) prekurzorske verige.

Razlog za obstoj dveh različnih Fuc transferaz je v trodimenzionalni strukturi prekurzorskih verig tipa 1 in 2. Dostopnost do 2-hidroksilne skupine končne Gal je pri tipu 1 prekurzorske verige sterično ovirana z acetilno skupino N -acetilgalaktozamin (GalNAc), medtem ko je pri tipu 2 prekurzorske verige hidroksilna skupina veliko bolj dostopna za reakcijo. (2)

Na Ag H pa se s pomočjo encima *N*-acetilgalaktozamiltransferaze (GalNAc transferaza ali glikoziltransferaza A) veže na končno GalNAc in nastane antigen A. Glede na količino prisotnega Ag A na Erci in v telesnih tekočinah razdelimo krvne skupine A na različne podskupine. (2)

Dve najpomembnejši podskupini sta A₁ in A₂. Med seboj se razlikujeta kvalitativno in kvantitativno. Pri skupini A₁ je na Erci večja količina Ag mest kot pri krvni skupini A₂. To pa je posledica razlik med α -3-*N*-acetil-galaktozamiltransferazama, ki sta produkta genov A₁ in A₂. Gena se med seboj razlikujeta v deleciji dveh baz, ki se nahajata blizu C-terminalnega konca. (1)

Poleg teh dveh podskupin poznamo še druge podskupine, med njimi A₃ in A_x, A_{el}, A_m, ki pa se pojavljajo redkeje. Približno 40 % prebivalcev v Sloveniji ima krvno skupino A (8).

Če pa se na končno Gal Ag H veže še ena Gal s pomočjo galaktozamiltransferaze (Gal transferaza ali glikoziltransferaza B), pa nastane antigen B. Pogostost krvne skupine B je pri slovenskem prebivalstvu približno 15 %. (2)

Podskupine B so še manj pogoste kot podskupine A. Krvno skupino B podobno kot skupino A delimo na več podskupin: B₃, B_x, B_m in B_{el}, podobnega fenotipa, kot je A₂, pa pri krvni skupini B ni. (2)

Nekatere od teh AB(H) struktur so še nadalje transformirane z vezavo druge Fuc na sladkor v prekurzorski verigi. Produkt so difukozilirane AB(H) strukture, ki jih imenujemo Lewis strukture. Te so našli le na prekurzorskih verigah tipa 1 in 2. (2)

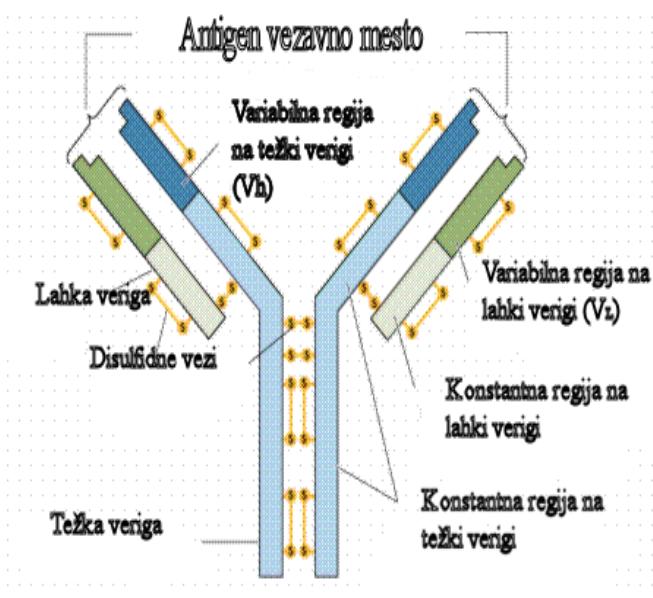
1.2. PROTITELESA

Če živali apliciramo Ag parenteralno, nazalno ali pulmonalno, bodo v njej nastali glikoproteini, ki selektivno reagirajo s tem Ag. Glikoproteine, ki spoznajo ta Ag in z njim reagirajo, imenujemo Abs. Drugo spološno ime je imunoglobulin (Ig), kar pomeni, nosilec imunosti v globulinski frakciji seruma. (9)

1.2.1. Zgradba protiteles

Zgradbo Abs so začeli proučevati pred več kot 50 leti. Pri prvih proučevanjih so uporabljali mešanice Abs, ki se naravno nahajajo v krvi imuniziranih oseb. Vsako takšno Ab izhaja iz določnega klena limfocitov B, ki so edine celice v telesu, ki izdelujejo Abs in se razlikujejo po specifičnosti za Ag. Taka Abs so poimenovali **poliklonska**. Leta 1975 pa sta Köhler in Milstein opisala metodo imortalizacije limfocitov B iz imunizirane živali, kar je omogočilo pripravo **monoklonskih** Abs (istovetna, med seboj so po zgradbi enaka, enako imajo tudi specifičnost za Ag). (9)

S pomočjo reduktivnega cepljenja so ugotovili, da je molekula Ig sestavljena iz dveh težkih in dveh lahkih verig, ki so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi. Nadalje so pokazali, da lahko z razcepitvijo Abs s papainom dobimo tri fragmente. Dva od teh sta istovetna in ju imenujemo Fab. Pomembna sta, ker ima vsak od njiju eno vezisko za Ag. Tretji fragment Fc pa nima zmožnosti vezanja z Ag, ima pa pomembne biološke funkcije, kot so:



Slika 2: Osnovna zgradba Ab (10): vezavno mesto za Ag z variabilnimi regijami na težki in lahki verigi ter konstantna regija težke in lahke verige.

Ig so glikoproteini z oligosaharidi, ki so kovalentno vezani na fragment Fc v težkih verigah. Vsak oligosaharid ima temeljno deblo, ki se na koncu razveji. Deblo je pritrjeno na asparaginski ostanek s kovalentno vezjo na N-acetylglukozamin. Položaj oligosaharidov je pri različnih razredih Ig različen. (9)

vezanje kplementa, vezanje na celice itd. Mesto, kjer papain lahko razcepi verigo, se imenuje "gibljivo mesto" ali zglob. (9)

Z različnimi metodami pa so ugotovili tudi, da ima molekula Ig obliko črke Y. Približno v sredini težke verige sta oba fragmenta Fab pritrjena na Fc. To mesto je gibljivo in omogoča, da se kot med fragmentoma Fab lahko spreminja od 0 do 180 °. (9)

Abs imajo dve poglavitni funkciji, in sicer **neposredno vezanje z Ag** ter **efektorske funkcije** (vezava komplementa in opsonizacija). Primarna funkcija je vezava Ag ob vdoru v telo. To pa sproži nastanek številnih različnih Abs, ki imajo različno afiniteto do Ag in različne biološke lastnosti (efektorske funkcije). (9)

1.2.1.1. Antigenske determinante

Ig so beljakovine in imajo kot vse beljakovine številne Ag determinante ali epitope. Če Ig vbrizgnemo primernemu prejemniku, nastanejo proti njim Abs. Take determinante so:

Izotipske determinante:

So tiste, ki so skupne vsem Ig določene živalske vrste in so na težkih in luhkih verigah. Torej se **izotipi različnih vrst med seboj razlikujejo**. Po človeških determinantah težkih verig razvrstimo Ig v pet razredov (**izotipov**): **IgG, IgA, IgM, IgD** in **IgE** ter v podrazrede IgG 1 - 4 in IgA 1 - 2. (9)

Različni izotipi so povezani z raznimi efektorskimi funkcijami, nimajo pa nobene zveze z vezanjem Ag, torej s specifičnostjo. Abs različnih razredov so lahko specifična za isti Ag. Določujemo jih z antiserumi, ki jih pripravimo tako, da Ig ene živalske vrste vbrizgamo živali druge vrste. (9)

Izotipske determinante luhkih verig razdelimo v dva razreda ali izotipa: κ in λ . Zanimivo je, da se oba tipa sočasno nahajata v vsakem človeku. Protitelesne molekule v vsakem človeku so torej v dveh tipih: v tipu z luhkimi verigami κ in v tipu z luhkimi verigami λ . (9)

Alotipske determinante:

Odsevajo **majhne razločke v aminokislinskem zaporedju v Ig določenega razreda različnih posameznikov iste živalske vrste**. Te določajo alelni geni in se dedujejo po Mendlovih pravilih. Ti označevalci niso povezani niti z veziščem za Ag niti z drugimi biološkimi funkcijami. (9)

Alotipe določamo z aloantiserumi. Človek lahko izdeluje, npr. po transfuziji krvi, Abs (aloprotitelesa) proti Ig drugega človeka, če se razlikujejo po alotipih. Pri tem nastajajo Abs proti alotipom, vendar do sedaj še niso opazili, da bi pri verigah IgG in IgM, ki sta značilni za protitelesa krvnoskupinskega sistema AB0, prišlo do alergijskih reakcij. **Hude reakcije** pa nastanejo zaradi neenakih alotipov IgA. (9)

Idiotipske determinante:

Vsako **vezišče za Ag je določeno z drugačnim aminokislinskim zaporedjem**. Del tega zaporedja so idiotipske determinante (**idiotipi**). Ti lahko **spodbudijo nastajanje Abs v lastnem telesu**. Predpostavljam, da med imunskim odzivom na Ag nastajajo tudi

antiidiotipska Abs proti površinskim Ig odzivnih limfocitov B in uravnavajo stopnjo imunskega odziva. (9)

1.2.1.2. Vezišče za antigen

Protitelesno vezišče za Ag se nahaja v fragmentu Fab, oziroma natančneje, v hipervariabilnih regijah (CDR) segmenta V_L in V_H . Ta dva segmenta imata največjo variabilnost zaporedja. To je razmerje števila različnih aminokislin na določenem položaju in frekvence najbolj pogostih aminokislin na tem položaju. V_L se nahaja na lahki verigi izotipa κ ter na lahki verigi izotipa λ , V_H pa na težki verigi. (9)

Spremembe v hipervariabilnih regijah nastanejo zaradi spontanih mutacij ali zaradi usmerjene mutageneze. Vse to pa lahko spremeni specifičnost Abs. Poleg aminokislinskega zaporedja hipervariabilnih regij pa na vezavo Ag vpliva tudi ogrodní del vezišča. (9)

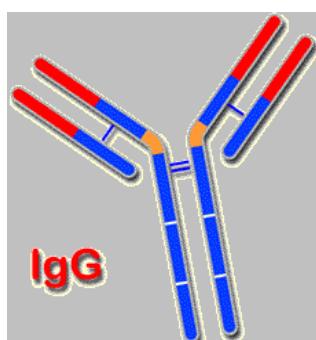
Stabilen kompleks Ag-Ab nastane vedno, kadar je med njima zadosti trdnih vezi, ki delujejo na kratko razdaljo. Ni nujno, da se determinante natančno prilegajo. Ag se na vezišče prilegajo na različne načine in vsak tip Ab ima drugačen spekter determinant, s katerimi se lahko veže. (9)

1.2.2. Strukturne značilnosti posameznih razredov protiteles

Ker se v krvnoskupinskem sistemu AB0 pojavljajo samo Abs razredov IgG in IgM, bomo predstavili samo značilnosti teh dveh razredov.

IgG

So monomerne molekule, ki lahko zavzamejo obliko črke T ali Y. Tako lahko ena molekula Ab veže enake epitope na različnih molekulah ali celicah ali pa se pritrdi na dva enaka epitopa na isti molekuli Ag, če sta si epitopa dovolj blizu skupaj. V tem razredu so



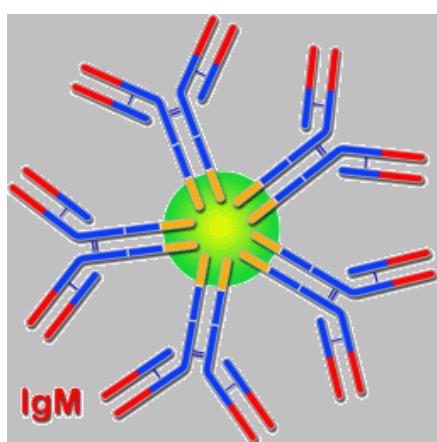
Slika 3: Molekula IgG (11)

štirje podrazredi Ig1, Ig2, Ig3 in Ig4, ki se med seboj razlikujejo po številu S-S vezi (disulfidne vezi) v zglobu molekule. Monoklonska Abs (mAbs) lahko vežejo le en Ag, zato so monoreaktivna. (9)

IgG so približno enakomerno porazdeljena v krvi in tkivnih tekočinah. Njihova življenska doba je od vseh Ig najdaljša (do 40 dni). Prehajajo skozi placento in dajajo otroku zaščito pred okužbo v prvih tednih življenja, dokler sam ne začne izdelovati lastnih Abs. Podrazredi IgG imajo različne zmožnosti aktiviranja komplementa. (9)

IgM

Imajo veliko molekulsko maso, ker so sestavljena iz 5 enot, povezanih med seboj z vezmi S-S blizu gibljivega mesta v težki verigi. Za aglutinacijsko aktivnost je potrebno vsaj dvoje vezič. Izguba aglutinacijske aktivnosti je posledica majhne afinitete posameznega veziča, ali pa podenota IgMs ne more zavzeti oblike T, ki je najbolj ugodna za aglutinacijo. Ker imajo Abs IgM dve veziči na vsaki enoti, bi morala imeti cela molekula deset vezič, vendar so pri številnih Ag ugotovili, da jih ima manj. Manjšo valenco pri večjih molekulskih masah Ag gre pripisati medsebojnemu prostorskemu oviranju molekul Ag. IgM zaradi svoje velikosti slabo difundira, zato ga najdemo v medceličnih tkivnih tekočinah v zelo majhnih količinah. Zato je zelo pomemben kot dopolnilni sekrecijski Ig. Nademo jih tudi med tako imenovanimi "naravnimi" Abs. To so tista, ki so navzoča v plazmi normalnih ljudi in so nastala brez znane imunizacije. (9)



Slika 4: Molekula IgM (11)

IgM so polireaktivna, saj se lahko vežejo z dvema ali več različnimi Ag. Pri odzivu na nekatere polisaharidne Ag, ki so dovolj blizu skupaj, se lahko molekula IgM pritrdi z več

ali vsemi vezišči na površino. Čeprav je konstanta trdnosti za posamezno determinanto majhna, dajejo vse vezi skupaj zelo trdno kombinacijo. (9)

1.2.3. Reagenti za določanje krvnih skupin

Reagenti za določanje krvnih skupin so:

- poliklonski,
- monoklonski.

Poliklonski reagenti (serumi) so se uporabljali vse do devetdesetih let prejšnjega stoletja. Pripravljeni so jih iz plazme prostovoljcev, ki so jih kasneje tudi dodatno imunizirali, da so s tem povečali titer Abs (12).

Potem pa so jih zamenjali monoklonski reagenti, ki se uporabljajo še danes. Te pa sestavljajo supernatanti z mAbs, različne dodane soli, ki izboljšajo lastnosti reagenta, ter barva, po kateri se loči specifičnost posameznega reagenta.

Pridobivanje mAbs je mnogo lažje, saj jih v skladu z dobro proizvodno prakso (GMP) in dobro laboratorijsko prakso (GLP) lažje standardiziramo, ker imajo Abs enake lastnosti (12).

1.3. STABILNOST

Stabilnost zdravil je po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) sposobnost farmacevtskega izdelka, da v času roka uporabnosti ohranja svoje karakteristike znotraj določenih mej. Pri tem obravnavajo kemične, fizikalne, mikrobiološke in biofarmacevtske stabilnostne vidike. (13)

WHO podaja tudi definicijo stabilnostnih testov. To so testiranja, namenjena pridobivanju informacij o stabilnosti farmacevtskega izdelka z opredelitevijo njegovega roka uporabnosti in roka utilizacije (to je rok uporabnosti za končno farmacevtsko obliko v odprtih multidozni posodi) za določeno ovojnino in pri določenih pogojih shranjevanja. (13)

Rok uporabnosti pa je po definiciji International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH) časovno obdobje, v katerem se pričakuje, da zdravilo ostaja znotraj potrjenih mej roka uporabnosti pod pogojem, da se shranjuje pri pogojih navedenih na nalepki v predlagani embalaži. (14)

Kadar je za razpadne produkte znano, da niso toksični, se kot rok uporabnosti smatra čas do 90 % deklarirane vsebnosti. Predpostavka pri tem je, da je upad jakosti klinično nepomemben. (13)

1.3.1. Testiranje stabilnosti

Stresno testiranje se po ICH izvaja pri ostrejših pogojih kot pospešeno testiranje. Namen je razjasniti intrinzično stabilnost (ugotavljanje razpadnih mehanizmov in produktov). Stresni pogoji so lahko: različna relativna vlažnost, povišana temperatura od 40 do 50 °C, sprememba pH, oksidacija, fotoliza. (14)

Pospešeno testiranje pa se kot del formalnega testiranja izvaja pri pogojih, ki odstopajo od predvidenih, krajši čas. Namen je dokazovati odpornost zdravilne učinkovine ali izdelka. V okviru raziskav se izvaja pri pogojih, ki pospešujejo razpadne procese z namenom napovedovanja stabilnosti pri poljubnih pogojih. (14)

ICH predлага za zdravila, ki jih sicer hranimo v hladilniku, pospešeno testiranje pri naslednjih pogojih: $+25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter 60 \% relativni vlažnosti (RH) $\pm 5\text{ \%}$ RH in sicer najmanj 6 mesecev. Če se signifikantne spremembe pojavijo že med tremi in šestimi meseci, moramo rok uporabnosti določiti na osnovi podatkov dolgoročnega testiranja ($+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ najmanj 12 mesecev), saj podatki pospešenega testiranja v tem primeru niso zanesljivi. Potrebni so najmanj trije alikvoti posameznega vzorca odvzetega ob času 0, 3 oz. 6 mesecev. (14)

Naši SN so mAbs, ki spadajo v posebno skupino proteinov. Zato bomo v naslednjih dveh poglavjih predstavili, kakšne so razlike v stabilnosti oz. nestabilnosti proteinov in Abs.

1.3.2. Stabilnost proteinov

Nestabilnost proteinov je lahko kemijska ali fizikalna. Kemijska nestabilnost se nanaša predvsem na procese, ki vodijo do nastanka ali cepitve kovalentnih vezi in s tem do nastanka nove kemijske entitete. Sem spadajo reakcije proteolize, deamidacije, racemizacije, oksidacije in eliminacije. Fizikalna nestabilnost pa pomeni vse ostale spremembe, od katerih je najpogostejša denaturacija oz. izguba urejene terciarne zgradbe

pravilno zvitega proteina. Sem pa spadajo predvsem procesi agregacije, obarjanja in adsorpcije. (15)

Temperatura, ionska moč, stresanje in adsorpcija na površine so glavni fizikalni dejavniki, ki povečajo hidrofobno površino proteina in s tem povzročijo agregacijo. Na tak način zmanjšajo termodinamsko neugodne interakcije med topilom in hidrofobnimi deli proteina. Proteinski agregati imajo lahko zato zmanjšano aktivnost, topnost ali se jim spremeni imunogenost. (15)

Agregacija je lahko reverzibilen ali ireverzibilen proces. Ireverzibilen je takrat, ko agregatov ne moremo več raztopiti. Takšni so pogosto termično inducirani agregati. Reverzibilni agregati pa so energetsko stabilnejši, bolj urejeni in manj gosti. (15)

Poleg agregacije je pogost fizikalni pojav tudi adsorpcija proteinov na površine, ki je posledica površinskih interakcij, saj je osnovna lastnost proteinov prav visoka površinska aktivnost. (15)

Stabilnost proteinov lahko povečamo na več načinov. Proteine lahko hidratiramo in jih s tem stabiliziramo, lahko jim dodamo tudi različne pomožne snovi. Sladkorji in polioli se pogosto dodajajo kot nespecifični stabilizatorji, stabilizacija pa je odvisna predvsem od njihove koncentracije. Uporablja se saharoza, sorbitol, manitol in še nekateri. Za preprečevanje adsorpcije na površine se uporabljajo večinoma neionske površinsko aktivne snovi, kot so Tweeni 20, 40 in 80, Pluronice F68, F88 in F127 in drugi. Anionske površinsko aktivne snovi uporabljajo tudi za izboljšanje termične stabilnosti proteinov v nevodnih medijih, kjer z njimi tvorijo komplekse. Za stabilizacijo pa se dodajajo tudi polimeri, kot so PVP, dekstran, heparin, in aminokisline histidin, asparagin, lizin in še nakatere. (15)

1.3.3. Stabilnost protiteles

Abs so kemijsko Ig, ki prav tako spadajo med proteine, zato so enako kot proteini izpostavljeni fizikalnim in kemijskim razgradnim procesom. Vendar pa so, na splošno, bolj stabilni kot ostali proteini. Raziskave kažejo, da je za takšno stabilnost verjetno odgovorna glikozilacija. (16)

Ko so z IgG odstranili oligosaharide, so ugotovili, da so Abs postala bolj občutljiva na delovanje večine proteaz, zmanjšala pa se je tudi njihova sposobnost vezave Ag pri postopkih ELISA (imunokemijska metoda). (16)

Fizikalna nestabilnost

Fizikalna nestabilnost se pri Abs kaže predvsem kot *denaturacija* in *agregacija*.

Abs se *denaturirajo* pod različnimi pogoji, ki vključujejo tudi temperaturne spremembe in različne procese, kot je npr. liofilizacija. V primerjavi z ostalimi proteini Abs kažejo tudi večjo odpornost na temperaturne strese. Dokler temperatura ne naraste nad +70 °C, se Abs ne denaturirajo popolnoma, medtem ko se ostali proteini denaturirajo pod temperaturo +70 °C. Kaže pa, da so ostali proteini nekoliko bolj obstojni kot Abs pri liofilizaciji, saj se njihova sekundarna struktura ohrani, izgubijo pa aktivnost, kar je verjetno posledica izgube terciarne strukture, to pa vpliva na konformacijske spremembe. Pri Abs pa liofilizacija povzroči izgubo *in vivo* imunogenosti. (16)

Bolj pogost pojav fizikalne nestabilnosti pa je *agregacija*. Opažajo, da je večja verjetnost nastanka agregatov, če je v vzorcu večja koncentracija Abs. Agregacija se poveča tudi, če povišamo temperaturo, viskoznost, pH in ionsko moč. Nanjo vpliva tudi mešanje, dolgotrajno shranjevanje, proces zamrzovanje-taljenje, liofilizacija,... (16)

Pri nekaterih Abs so opazili, da so se agregirala, če so jih izpostavili temperaturam pod +37 °C (npr. 10 do 12 °C). Ob povisanju temperature pa je bil proces reverzibilen. Sklepajo, da nizke temperature pri teh Abs zmanjšajo hidrofobne interakcije, ki so glavna sila pri zvijanju proteinov. Tako postanejo hidrofobne regije bolj izpostavljene topilu, kar poveča intermolekularne hidrofobne interakcije, posledično pa vodi v agregacijo. (16)

Proces ponavljačega zamrzovanja in taljenja tudi vodi do nastanka agregatov, ki pa so največ dimeri. Pri tem so opazili, da največja količina dimerov, to je okrog 20 %, nastane pri pH 6,5, najmanj, manj kot 2 %, pa pri pH pod 5,5 in nad 8,5. Poleg tega so ugotovili, da je proces reverzibilen, če vzorec po tem izpostavimo za nekaj ur temperaturi +37 °C. (16)

Raziskave kažejo tudi, da so izolirane Fab regije bolj nagnjene k nastanku agregatov po procesu ponavljačega zamrzovanja in taljenja kot celotna Abs. (16)

Kemijska nestabilnost

Poleg fizikalne pa je pomembna tudi kemijska nestabilnost Abs, ki jo povzročajo temperaturne spremembe. (16)

Pogosta reakcija, ki nastane pri shranjevanju vzorcev z Abs, je oksidacija prostih -SH skupin v disulfidne aggregate, ki so večinoma di- in trimeri. Pogosto pa med shranjevanjem

nastanejo tudi velike količine deamidiranih produktov, ki so nastali večinoma zaradi deamidacije asparagina v aspartat. Tudi izomerizirani produkti pogosto nastanejo. Značilna aminokislina, ki izomerizira, je asparaginska kislina. Oksidirani ostanki aminokislin tudi niso redki. To so tirozin, triptofan, histidin, cistein in najpomembnejši metionin. (16)

Stabilnost Abs lahko povečamo na enak način kot pri proteinih. Pri zaščiti fizikalne stabilnosti se večinoma uporablajo sladkorji, kot so saharoza, trehaloza, glukoza in aminokislina histidin, predvsem pri zmanjševanju nastajanja agregatov pri procesu ponavljajočega zamrzovanja in taljenja. Včasih je boljša izbira kombinacije aminokislin histidina in arginina. (16)

Pri inhibiciji kemijske razgradnje pa se dostikrat uporablja trehaloza. Za preprečevanje oksidacije je znana kombinacija manitola z benzil alkoholom ali pa splošno uporabna antioksidanta, kot sta tiosulfat ali metionin. (16)

Pogosto se uporablajo tudi surfaktanti, vendar imajo zelo negativen učinek pri dolgotrajnejšem shranjevanju. (16)

Po vseh zbranih podatkih so pri študiju pospešenega staranja vzorcev Abs prišli do ugotovitve, da je temperatura steklastega prehoda (T_g), to je za Abs nekje okrog $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$, boljši napovedovalec stabilnosti formulacij, kot če bi podatke zbirali pri višjih temperaturah, npr. pri $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$. (16)

T_g lahko smatramo kot tališče amorfnih snovi in proteini se večinoma nahajajo v amorfнем stanju. Če vzorce s proteini hranimo pri temperaturi, ki je nižja od T_g in zaščiteno pred vlago, potem zmanjšamo fizikalne spremembe. Ob prisotnosti vlage pa se T_g niža, saj voda deluje kot plastifikator, pri tem molekule postanejo bolj gibljive in poveča se fizikalna in kemijska nestabilnost. (17)

1.4. METODA AGLUTINACIJE

Že prva testiranja, ki jih je izvajal Karl Landsteiner, so temeljila na metodi aglutinacije. Zanimivo je, da se je metoda skozi zgodovino transfuzijske medicine ohranila in se v različnih tehnikah še vedno uporablja za določanje krvnih skupin, saj je enostavna, hitra in zanesljiva. Določanje krvnih skupin lahko izvedemo (18):

- na stekelcu, na porcelanasti ploščici ali na plastificirani papirnati ploščici primerne kakovosti (za enkratno uporabo); če uporabljam posušene reagente, se test imenuje bed-side test (obposteljni test),
- v stekleni ali plastični epruveti,
- na mikrotitrski ploščici,
- z gelsko tehniko.

Občutljivost narašča od prve proti zadnji tehniki. (18)

Aglutinacija Erci poteka v dveh fazah:

- vezava Abs na Erci, ki jo imenujemo senzibilizacija,
- nastanek mostov med senzibiliziranimi Erci in nastanek mreže, ki je pogoj za aglutinacijo.

Na vsako stopnjo vpliva mnogo dejavnikov.

1.4.1. Dejavniki, ki vplivajo na prvo stopnjo (senzibilizacijo)

Asociacija Ag in Abs je reverzibilna. Na količino Abs, ki se pri ravnotežju veže na Ag, vpliva ravnotežna konstanta oz. afinitetna konstanta Abs. Večja ko je ravnotežna konstanta, bolj je reakcija pomaknjena v smer asociacije in stopnja disociacije je manjša. Na asociacijo Ag in Abs vpliva koncentracija Ag in Abs ter različni fizikalni pogoji kot so pH, ionska jakost in temperatura. S spremembami fizikalnih pogojev lahko občutljivost aglutinacijskih testov povečamo ali pa zmanjšamo. (18)

Temperatura

Večina Abs proti krvnoskupinskim Ag reagira v določenem temperaturnem območju. Splošno velja, da so Abs razreda IgM reaktivnejša pri nižjih temperaturah (+4 °C do +27 °C), medtem ko Abs razreda IgG bolje reagirajo pri +37 °C. Abs, ki *in vitro* reagirajo le pri temperaturah pod +37 °C, navadno niso klinično pomembna. Klinično pomembna pa so tista Abs, ki *in vivo* povzročijo hemolizo Erci oz. so sposobna aktivirati komplement. (18)

pH

Optimalni pH za večino Abs proti krvnoskupinskim Ag ni določen. Za rutinsko delo je najprimernejši pH okoli 7,0. Mnogi uporabljajo pri seroloških testih fiziološko raztopino s pH med 4,5 in 7,0. (18)

Čas inkubacije

Čas, ki je potreben, da se doseže ravnotežje, je za različna Abs različen. Precejšnji vpliv na čas inkubacije ima Ig razred Abs (IgM, IgG). (18)

Ionska jakost

V fiziološki raztopini so prisotni Na in Cl ioni, ki delno nevtralizirajo nasprotne naboje na molekuli Ag in Abs. (18)

Razmerje antigen-protitelo

Na hitrost vezave Ag in Abs vpliva število molekul Ag v mediju in število Ag mest na celici. Če povečamo koncentracijo Abs (do določene koncentracije), lahko povečamo občutljivost testa, saj je na razpolago več molekul Abs na razpoložljivo število Ag mest. (18)

1.4.2. Dejavniki, ki vplivajo na drugo stopnjo (aglutinacijo)

Razdalja med celicami

Obstaja mnogo teorij, ki razlagajo, kako se Erci povežejo v mrežo. Molekule IgG so premajhne, da bi lahko povezale Erci, ki so oddaljeni zaradi odbojnih sil. Erci so negativno nabiti in ioni v raztopini, v kateri so resuspendirani, vplivajo na njihov površinski naboј. Jakost naboja se zato zmanjša (izmerjeno napetost imenujemo zeta potencial). Razdalja med Erci je sorazmerna z zeta potencialom. Če naboј, ki ločuje Erci, zmanjšamo, se Erci približajo in Abs razreda IgG jih lahko aglutintirajo. (18)

Nekateri pa zagovarjajo t.i. teorijo hidratacijskega ovoja. Erci naj bi bili oddaljeni zaradi molekul vode, ki so tesno vezane na njihovo površino in obdajajo Erci kot plašč. Ab, ki se veže na Ag na površini Erci, zmanjša plast vodnih molekul in tako poveča možnost aglutinacije. (18)

Vpliv encimov

Proteolitski encimi, ki jih uporabljamo v seroloških testih, odcepljajo sialoglikoproteine na površini Erci in tako zmanjšajo površinski naboј na celicah. Nevraminidaza zmanjša površinski naboј tako, da cepi N-acetil nevraminsko kislino (salična kislina). Če drži, da so Erci oddaljeni zaradi neto naboja na njihovi površini, potem vsaka reakcija, ki zmanjša celotni naboј na površini celice, ojača aglutinacijo. (18)

V imunohematoloških laboratorijih najpogosteje uporabljo papain, bromelain in ficin. Ti pa odcepljajo strukture, ki fizično ovirajo dostop Abs. Tako z encimi obdelani Erci lažje aglutinirajo Abs razreda IgG. Upoštevati pa moramo, da ti encimi lahko odcepijo tudi Ag mesta za nekatera druga Abs, kot so npr. anti-M, -Fy^a, -Fy^b. (18)

1.4.3. Ostali dejavniki

Nekatere teorije predpostavljajo, da proteolitski encimi vplivajo na prvo stopnjo aglutinacije. Polipeptidi, ki segajo iz Erci membrane, naj bi sterično ovirali vezavo Abs. Ko polipeptide s proteolitskimi encimi odstranimo, je vezava Abs mnogo lažja. (18)

Druge teorije predvidevajo, da je oblika Erci tista, ki je pomembna za reakcijo aglutinacije. Če imajo Erci spremenjeno obliko, se lažje približajo in na ta način “premagajo” odbojne elektrostatske sile. (18)

Možno je tudi, da na reakcijo aglutinacije vplivata mobilnost Ag in fleksibilnost membrane. Natančnih mehanizmov pa še vedno ne poznamo. (18)

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil iz skupine različnih celičnih linij izbrati tiste, ki proizvajajo visokoafinitetna, specifična in termostabilna mAbs ter približno ugotoviti njihov rok uporabnosti.

Cilji diplomske naloge:

- priprava banke standardnih Erci,
- gojenje mišjih hibridomskih celičnih linij, iz katerih smo pripravili SN, ki vsebujejo želena mAbs anti-A (a-A) in anti-B (a-B),
- pospešeno staranje SN – izmenično inkubiranje pri -20 °C in +37 °C ter ugotavljanje roka uporabnosti,
- staranje SN pri +55 °C – ugotavljanje termostabilnosti mAbs,
- ugotavljanje temperaturne točke stabilnosti,
- kloniranje dobre celične linije in ugotavljanje termostabilnosti mAbs kloniranih linij,
- določanje relativne vsebnosti in koncentracije mAbs s postopkom ELISA.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri delu smo uporabili naslednje reagente in kemikalije:

- Glicerol aditiv za zamrzovanje Erci
- Sorbitol za odmrzovanje Erci
- DMEM: Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu; (med drugim vsebuje: glukozo, soli, aminokisline)
- HEPES: $C_8H_{17}N_2O_4SNa$
- Fetal Clone I (FCS): inaktiviran goveji serum
- Antibiotika: streptomycin sulfat in penicilin
- Aminokislina L-glutamin (L-Glu)
- Nigrosin: barvilo; Sigma
- DMSO: dimetilsulfoksid
- Pufer A: karbonatno/bikarbonatni pufer za prekrivanje ploščice; (sestava: 15 mM Na_2CO_3 , 35 mM $NaHCO_3$, 3 mM MgN_3 , pH 9,6)
- Pufer B: fosfatni pufer za spiranje ploščice; (sestava: 150 mM NaCl, 7,5 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, 2,5 mM $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, 0,05 % Tween 20, pH 7,2)
- Pufer C: raztopina govejega serumskega albumina za blokiranje prostih mest; (sestava: 1 % BSA v pufru B, pH 7,2)
- Pufer D: citratno/fosfatni pufer za pripravo substrata; (sestava: 100 mM $C_8H_8O_7 \times H_2O$, pH 4,5)
- ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfonska kislina), Sigma
- H_2O_2
- Jackson[®]: anti-mišja IgG in IgM
- konjugat Jackson[®]: anti-mišja IgG in IgM, konjurirana s peroksidazo
- BSA: goveji serumski albumin, Sigma
- Fiziološka raztopina

3.2. METODE

3.2.1. Priprava, zamrzovanje in odmrzovanje eritrocitov

Za vsa testiranja na osnovi aglutinacije smo potrebovali Erci naslednjih krvnih skupin: A1, A2, A1B, A2B, B in 0, ki smo jih po ustreznem postopku oprali in zamrznili v tekočem dušiku. Tako smo pripravili standardne Erci, ki smo jih uporabljali pri vseh testiranjih.

Najprej smo Erci oprali. V 50 ml centrifugirke smo odpipetirali po 15 ml usedlih Erci posamezne krvne skupine in dolili približno 30 ml fiziološke raztopine ter centrifugirali na 1630 rcf (relativna centrifugalna sila) 10 min. Nato smo supernatant odstranili z vodno črpalko, ponovno dolili enako količino fiziološke raztopine in centrifugirali. Postopek smo ponavljali dokler ni bil supernatant popolnoma bister, oz. vsaj še enkrat. Po zadnjem spiranju smo supernatant pazljivo odsesali, kolikor je bilo mogoče. V vsaki centrifugirki je tako ostalo približno 10 ml koncentriranih Erci.

Po končanem spiranju smo v vsako centrifugirko dodali po 1/3 končne količine glicerola (končni volumen je enak volumnu Erci – torej približno 10 ml). Le-ta deluje kot krioprotektor, saj preprečuje nastanek ledenih kristalov pri zamrzovanju. Nato smo vse skupaj dobro premešali in inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Potem smo dodali še preostalo količino glicerola. Mešanico smo razpipetirali po 1,2 ml v ustrezne 2 ml ampule za zamrzovanje, ki smo jih predhodno označili. Ampule smo shranili v posodo s tekočim dušikom.

Tako smo imeli pri vseh testiranjih na razpolago Erci enake kakovosti. S tem smo zagotovili primerljivost rezultatov.

Ko smo potrebovali Erci določene krvne skupine, smo jih po posebnem postopku odmrznili. Najprej smo iz posode s tekočim dušikom vzeli ampulo, ki smo jo nato inkubirali v vodni kopeli pri največ +37 °C približno 1 min, da so se Erci odtalili. Nato smo ampulo centrifugirali 1 min na 1300 rcf. Supernatant smo pazljivo odsesali, Erci pa prenesli v plastično epruveto ter dodali enako količino sorbitola, kot je bilo Erci. Spet smo centrifugirali 1 min na 1300 rcf, odsesali supernatant ter dodali približno enako količino fiziološke raztopine. Erci smo spirali s fiziološko raztopino, dokler supernatant ni postal bister.

3.2.2. Priprava gojišča

Za gojenje mišjih hibridomov je najbolj primerno Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu (DMEM), ki vsebuje relativno visoko koncentracijo Glc (4,5 g/l) ter vse potrebne soli in aminokisline. DMEM-u smo dodali še 1,85 g/l NaHCO₃ in 10 mM HEPES-a. Tako gojišče je nekompletno.

Indikator pH vrednosti je navadno fenol rdeče (vijoličast pri pH 7,6, rdeč pri pH 7,0 ter rumen pri pH 6,5), gojišče pa je lahko tudi brez indikatorja. Nekompletno gojišče smo sterilno filtrirali skozi celuloznoacetatni filter z velikostjo por 0,2 µm in s tem zagotovili mikrobiološko neoporečnost. Tako pripravljeno gojišče smo lahko dalj časa hranili v hladilniku pri +4 °C.

Tik pred uporabo smo 100 ml nekompletnegogojišča dodali še 15 ml toplotno inaktiviranega govejega seruma Fetal Clone I (FCS), optimiranega za gojenje hibridomov, 1,2 ml L-Glu ter 0,4 ml streptomycin sulfata (100 µg/ml) in 0,4 ml penicilina (100 U/ml). Tako smo dobili kompletno gojišče.

Antibiotike smo dodali zaradi preprečevanja bakterijskih kontaminacij med gojenjem hibridomov.

L-Glu je esencialna aminokislina, ki je poleg Glc alternativni vir ogljika in prekurzor nukleotidov. Pri višji temperaturi hitro razpade, zato smo ga dodajali vsakih 14 dni.

FCS vsebuje vse komponente, ki so potrebne za rast mišjih in humanih hibridomov.

FCS, L-Glu in antibiotike smo hranili zamrznjene pri -20 °C.

Celice smo gojili v 25 cm² in 75 cm² plastičnih stekleničkah (Corning, Costar).

Kompletno gojišče smo uporabili tudi pri kloniranju celične linije 21B11, klone pa smo gojili v plastičnih ploščicah s 96 (96 well plate, Costar) in 24 (24 well plate, Costar) vdolbinicami.

3.2.3. Odmrzovanje in gojenje mišjih hibridomskeh celic

V centrifugirko smo odpipetirali 20 ml nekompletnegogladnega gojišča. Celice smo na hitro odtalili v vodni kopeli pri +37 °C, jih suspendirali v manjši količini pripravljenega gojišča in suspenzijo prenesli v centrifugirko. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut na 490 rcf, SN smo zavrgli, usedle celice pa prenesli v primerno količino (7 ml) običajnega kompletnegogojišča.

Celice smo pustili do naslednjega dne v mali steklenički v inkubatorju pri +37 °C in 5 % CO₂ atmosferi, ki je pomembna za zagotavljanje konstantnega pH (okrog 7,4). Celice so tako rasle v kontroliranih pogojih in v primerni vlažnosti (nasičenje z vodno paro).

Naslednji dan smo jih pregledali pod mikroskopom ter po gostoti celic presodili, kolikokrat jih bomo redčili s kompletnim gojiščrm ogretim na +37 °C. Tako smo vsak dan redčili celice približno v razmerju 1:3, ob koncu tedna pa bolj. Ko smo nagojili ustrezeno količino, smo celice nekaj časa pustili, da so izčrpale gojišče in začele propadati. Ko je bila viabilnost celic (to je delež živih celic) pod 5 %, kar smo določili s štetjem celic na hemacitometru, smo gojišče s celicami prenesli v centrifugirke ter centrifugirali 15 min na 870 rcf. Supernatante smo nato prelili v ustrezeno označene plastenke oz. steklenice in jih shranili v hladilniku pri +4 °C. Usedljino celic pa smo zavrgli.

S celicami smo delali v aseptičnem okolju v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka.

3.2.4. Štetje celic

Pred kloniranjem, zamrzovanjem ali centrifugiranjem smo celice prešteli in izračunali njihovo koncentracijo (za centrifugiranje to ni bilo potrebno) v suspenziji. Suspenzijo celic smo redčili (**R**) v 0,2 % raztopini barvila Nigrosin, ki obarva le odmrle celice. Tako lahko štejemo žive in mrtve celice in izračunamo viabilnost. Celice smo prešteli (**n**) na hemacitometru z globino 0,1 mm (**10⁴**) in po **enačbi 1** izračunali število celic v 1 ml. Za natančnejše meritve je potrebno štetje večkrat ponoviti ter zagotoviti čim bolj homogen vzorec, kar dosežemo s pogostim mešanjem vzorca na vibracijskem mešalniku.

Enačba 1:

$$\text{št. celic/ml} = n \times R \times 10^4$$

3.2.5. Zamrzovanje celic

Klonirane celice linije 21B11 smo do ustrezne količine gojili v malih stekleničkah ter jih nato po ustreznem postopku tudi zamrznili.

Celice z visoko viabilnostjo smo suspendirali in odvzeli vzorček za štetje celic. Preostalo suspenzijo smo za pol ure postavili v ledeno kopel. Med tem smo prešteli celice in pripravili primerno količino gojišča za zamrzovanje, ki je vseboval 10 % DMSO in 45 % FCS v nekompletнем gojišču. Gojišče za zamrzovanje smo prav tako postavili v ledeno kopel. Celice smo centrifugirali v hlajeni centrifugi (+4 °C) 5 minut na 490 rcf. Po

centrifugiraju smo SN zavrgli, celice pa suspendirali v primerni količini zamrzovalnega gojišča, tako da je bila končna koncentracija celic v ampulah za zamrzovanje $5\text{-}7 \times 10^6$ celic/ml. Ampule s celicami smo takoj prenesli na -70°C za 24 h, nato pa v tekoči dušik.

Vedno smo tudi preverili uspešnost zamrzovanja in sicer tako, da smo eno ampulico po že opisanem postopku odmrznili in po dveh urah preverili viabilnost celic. Če je ta znašala manj kot 30 %, smo postopek zamrzovanja ponovili.

Uspešnost zamrzovanja je predvsem odvisna od viabilnosti celic pred zamrzovanjem. Ta mora biti vsaj 90 %, pod mikroskopom pa morajo biti celice svetleče in okrogle.

3.2.6. Pospešeno staranje

S tako imenovanim pospešenim staranjem smo želeli v kratkem času ugotoviti, kakšna je stabilnost mAbs v SN. Odločili smo se za 7 ciklov pospešenega staranja, od katerih bo en cikel zajemal 24-urno zamrzovanje pri -20°C in nato še 24-urno inkubiranje pri $+37^\circ\text{C}$. Za vsako celično linijo smo tako napipetirali 8 alikvotov SN. Po enega od vsake linije smo do testiranja pustili v hladilniku pri $+4^\circ\text{C}$, ostale pa smo starali 1, 2, 3, 4, 5, 6 ali 7 ciklov. Trije do štirje cikli naj bi ustrezali dejanskemu času enega leta, če je reagent shranjen pri temperaturi od $+2$ do $+8^\circ\text{C}$. (19)

Vsem vzorcem smo po staranju določili titer in avidnost mAbs ter njihovo koncentracijo in afiniteto do Ag s testom ELISA. Do testiranja pa smo vse hranili v hladilniku pri $+4^\circ\text{C}$.

Vedno smo skupaj z vzorci testirali tudi standard ZTM (a-A oz. a-B) kot pozitivno kontrolo. Standard ZTM je reagent, shranjen pri -20°C , se uporablja pri vsakem testiranju novega reagenta in je primerljiv z WHO standardom.

3.2.7. Test staranja supernatantov pri $+55^\circ\text{C}$

Zanimalo nas je tudi, kaj bi se zgodilo z našimi SN, če bi jih segreli na $+55^\circ\text{C}$. Za to temperaturo smo se odločili, ker naj bi bila to meja za termostabilnost Abs. Torej tista Abs, ki pri tej temperaturi ostanejo aktivna, naj bi bila termostabilna (20).

Za vsak SN smo napipetirali po 6 alikvotov 0. cikla in 6 alikvotov 7. cikla v 2 ml mikrocentrifugirke. Vse cikle smo nameravali starati pri $+55^\circ\text{C}$, vendar smo se z ozirom na rezultate odločili, da staramo le 0. in 7. cikel. Vzorce smo segrevali v vodni kopeli 2, 4, 6, 8 ali 24 h. Po en alikvot 0. cikla in en alikvot 7. cikla posamezne linije pa smo shranili v hladilniku pri $+4^\circ\text{C}$ do testiranja. Šele ko smo imeli starane vse vzorce, smo se lotili

testiranja titra in avidnosti. S tem ko smo vse vzorce testirali ob istem času, smo zagotovili primerljivost rezultatov, saj smo se izognili vplivom iz okolja, ki se časovno spreminja. Tudi tu smo zraven testirali standarda ZTM.

3.2.8. Določanje titra protiteles

Titer Abs je obratna vrednost največje razredčine (tabela III), ki še pokaže vidno aglutinacijo (9).

Titriranje smo izvajali v mikrotitrskih ploščicah (MPL) posebne kakovosti (oprane s Tweenom 20) s 96 vdolbinicami v obliki črke U. SN smo redčili s fiziološko raztopino v razmerju 1:2, in sicer tako da smo v prvo vdolbinico v stolpcu odpipetirali po 50 µl SN, v drugo 50 µl SN in 50 µl fiziološke raztopine, v tretjo pa 50 µl fiziološke raztopine in 50 µl raztopine iz druge vdolbinice in tako dalje do 12. vdolbinice. Po dodatku 50 µl 1,67 % suspenzije standardnih Erci (če smo testirali a-A reagente, smo uporabili Erci A1, A2, A1B, A2B, če pa smo testirali a-B reagente pa B, A1B in A2B Erci) smo ploščice centrifugirali 2 minuti na 872 rcf. Aglutinate smo nato 8 sekund suspendirali na stresalniku in makroskopsko odčitali stopnjo aglutinacije. Pri višjem redčenju ko smo SN določili titer z jakostjo aglutinacije 4+, boljši je bil reagent (tabela II).

Tabela II: Ocenjevanje jakosti aglutinacije po Marshu (21)

JAKOST AGLUTINACIJE	OPIS AGLUTINATA
4+	En sam aglutinat; bistra raztopina.
3+	Močna reakcija; nekaj vidnih aglutinatov.
2+	Veliki aglutinati med majhnimi skupki; ni prostih Erci.
1,5+	Mnogo srednjih in majhnih aglutintov; prosti Erci v ozadju.
1+	Majhni aglutinati; prosti Erci v ozadju.
±	Majhni skupki v suspenziji Erci; številni aglutinati vidni pod mikroskopom.
0	Negativna makroskopska reakcija, tudi makroskopsko ni opaznih aglutinatov.

Pri določanju titra mAbs naših SN v MPL smo v vseh grafih namesto titra uporabili ustrezen oznako, ki je bila hkrati tudi zaporedna številka vdolbinice v vodoravni vrstici.

Tabela III: Načrt redčenja naših SN s fiziološko raztopino, ustrezen titer ter oznaka posamezne razredčine SN v MPL.

Oznaka	1	2	3	4	5	6
Titer	c	2	4	8	16	32
Redčitev	neredčen	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Oznaka	7	8	9	10	11	12
Titer	64	128	256	512	1024	2048
Redčitev	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048

3.2.9. Avidnost protiteles

Avidnost ali afiniteta Abs je definirana kot jakost vezi med Ag in Ab. V termodinamskem smislu je definirana kot energija, ki je potrebna, da se ta vez pretrga. (22)

Avidnost Abs je torej čas (v sekundah), ki mine od dodatka vzorca SN (oz. reagenta) k suspenziji standardnih koncentriranih Erci na plastificirani ploščici do nastanka prve vidne aglutinacije (18). Avidnost – čas aglutinacije je dobro merilo za konstanto asocijacije kompleksa Ag-Ab pri Ab razreda IgM proti Ag krvnoskupinskega sistema AB0, kajti reakcija je v takem sistemu hitra in praktično ireverzibilna.

Na plastificirano ploščico smo s pipeto kanili kapljico preiskovanega SN, zraven dodali kapljico 50 % suspenzije standardnih Erci in oboje premešali z leseno paličico. V trenutku, ko smo kapljici premešali, smo začeli meriti čas in ustavili merjenje, ko so se pojavili prvi vidni aglutinati.

3.2.10. Iskanje temperaturne točke stabilnosti

Izmed SN a-A smo izbrali po eno linijo mAbs razreda IgM, to je 21B11 in eno linijo mAbs razreda IgG, 3E7/2B6, izmed a-B pa 4D1/2B6, razreda IgM in 3A1/1E10, ki spadajo v razred IgG. Vzorce smo inkubirali 2 h pri različnih temperaturah, začetno temperaturo smo izbrali za vsak SN posebej, glede na njegove lastnosti. Linijo z mAbs 4D1/2B6 smo začeli segrevati pri +40 °C, ker smo v predhodnih testiranjih ugotovili, da je termično nestabilna

že pri +55 °C, ostale pa smo začeli segrevati pri +50 °C. Nato smo nadaljevali z naraščanjem temperature po 5 °C in zaključili pri +70 °C.

Ko smo določili titer in čas aglutinacije, smo se glede na dobljene rezultate (tam, kjer je bil viden večji padec titra) odločili, kateri temperaturni interval bomo podrobneje obdelali pri posameznem SN.

3.2.11. Kloniranje celične linije s protitelesi 21B11

Pri kloniranju smo želeli osamiti eno samo celico, ki bi proizvajala specifična mAbs in na tak način pridobiti monoklonsko celično linijo. Pred kloniranjem celičnih linij je dobro, da so celice v eksponentni fazi rasti, takrat so v najboljši kondiciji.

Hibridome smo klonirali po najpogosteje uporabljeni metodi omejenega redčenja (»cloning by limiting dilution«). Celice, ki smo jih želeli klonirati, smo prenesli v centrifugirko, dobro premešali na vibracijskem mešalniku, odvzeli 100 µl vzorca za štetje živih celic in izračunali koncentracijo celic v suspenziji. S serijo postopnih redčitev suspenzije v nekompletinem DMEM gojišču smo prišli na koncu do ustrezne, željene redčitve (redčili smo zato, da smo prišli do čim nižje koncentracije in tako lahko odpipetirali večjo količino suspenzije celic).

Ustrezno redčeno suspenzijo celic smo nato prenesli na ploščici s 96 vdolbinicami (100 µl /vdolbinico) in ju postavili v inkubator.

Pod mikroskopom smo v vzorcu prešteli žive celice in dobili naslednjo koncentracijo: $1,5 \times 10^5$ celic/ml. Ker smo želeli v vsaki vdolbinici na ploščici imeti samo eno celico, smo torej potrebovali koncentracijo $c_k = \text{Icelica}/100 \mu\text{l}$. Celice s koncentracijo $1,5 \times 10^5$ celic/ml smo postopoma redčili z nekompletnim gojiščem in prišli do koncentracije $c_{vz} = 7,5 \times 10^2$ celic/ml. Ker smo za kloniranje nameravali uporabiti dve ploščici s po 96 vdolbinicami, vsaka pa je držala 100 µl, smo potrebovali približno $V_k = 20 \text{ ml}$ suspenzije celic v nekompletinem DMEM gojišču. Po naslednji **enačbi 2** smo izračunali, koliko suspenzije s koncentracijo $7,5 \times 10^2$ celic/ml potrebujemo:

Enačba 2:

$$(c_k \times V_k) / c_{vz} = V_{vz}$$

$$V_{vz} = 267 \mu\text{l}$$

Napipetirali smo torej 267 µl suspenzije celic, ki smo jo prej postopoma redčili, in s kompletним DMEM gojiščem dopolnili do 20 ml. S tako pripravljeno suspenzijo smo napipetirali ploščici in ju postavili v inkubator.

Kot zagotovilo, da so celice, ki zrastejo v eni vdolbinici, res proizvod enega samega klonja, smo ploščice že naslednji dan skrbno pregledati pod invertnim mikroskopom in poiskali vdolbinice z enim samim klonom. Po enem tednu smo odvzeli SN iz vseh vdolbinic z enim klonom in testirali titre dobljenih mAbs z ustreznimi Erci, da bi ugotovili, če so mAbs specifična. Potem smo gojili zgolj tiste celice, za katere smo ugotovili, da proizvajajo specifična mAbs v primernih količinah. Po vseh testiranjih smo izbrali najboljše klone, ki smo jih po že opisanem postopku tudi zamrznili.

3.2.12. Postopek ELISA

ELISA (ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je imunska tehnika, ki se uporablja za dokazovanje prisotnosti Abs ali Ag v vzorcu in temelji na specifični reakciji Ag – Ab. Primerna je tudi za določanje koncentracije Ab ali Ag. Uporabljamo jo tudi za določanje specifičnih izotipov protiteles. (15)

Kadar v vzorcu določamo specifična Abs, uporabimo posredni (indirektni) postopek ELISA, kadar določamo prisotnost Ag v vzorcu, uporabimo sendvič ELISA-o. Če pa so specifična primarna Abs že konjugirana z encimom za detekcijo, govorimo o neposrednem (direktnem) postopku ELISA. (4)

Postopek ELISA smo izvajali v MPL s 96 vdolbinicami z ravnim dnom (Nunc-Immuno™ Plate, Danska).

3.2.12.1. Posredni postopek ELISA

Vdolbinice MPL smo prekrili z Ag A oz. B. Po inkubaciji smo nezasedena mesta blokirali s pufrom. V naslednji stopnji smo v vdolbinice nanesli ustrezeno redčene vzorce SN, po inkubaciji pa smo na ploščico nanesli še sekundarna anti-mišja, s hrenovo peroksidazo označena Abs. Ta so specifična za primarna Abs, ki se nahajajo v vzorcih. Po tem, ko smo dodali substrat ABTS, pa se je raztopina, kjer so bila vezana mAbs iz naših vzorcev, obarvala zeleno.

- Prekrivanje dna vdolbinic s $100\times$ redčeno substanco A oz. substanco B ($c=10\ \mu g/ml$) v pufru A, $100\ \mu l/vdolbinico$; inkubacija čez noč pri $+4\ ^\circ C$;
- Spiranje nevezane substance s pufrom B (na spiralcu ploščic);
- Blokiranje nezasedenih mest s pufrom C po $150\ \mu l/vdolbinico$; ploščico inkubiramo $30\ min$ pri $+37\ ^\circ C$;
- Spiranje nevezanega pufra C s pufrom B (na spiralcu ploščic);

- Nanos primerno redčenih vzorcev (kamor smo nanesli substanco A, smo nanesli vzorce a-A, kamor pa smo nanesli substanco B, smo nanesli vzorce a-B) v pufru C (1. vdolbinica v koloni 10× redčenje, ostalih 7 vdolbinic v koloni 5× redčenje); 100 µl/vdolbinico, inkubiramo 90 min pri +37 °C;
- Spiranje nevezanih vzorcev s pufrom B (na spiralcu ploščic);
- Nanos konjugata (konjugat Jackson®) 5000× redčenega v pufru C; 100 µl/vdolbinico; inkubiramo 90 min pri +37 °C;
- Spiranje nevezanega konjugata na spiralcu ploščic;
- Inkubacija raztopine substrata ABTS, pri čemer se v vdolbinicah, kjer je prišlo do vezave, razvije barvna reakcija; substrat smo pripravili tako, da smo 1 mg tabletko ABTS med stresanjem na mešalu raztopili v 10 ml pufra D ter tik pred nanosom na ploščico dodali še 4 µl 30 % H₂O₂; 100 µl/vdolbinico; inkubacija 20 min pri +37 °C;
- Detekcija – merjenje absorbance zelenega produkta pri valovni dolžini 405 nm in referenčnem filtru 620 nm na spektrofotometru za MPL (Sunrise, Tecan plate reader).

3.2.12.2. Metoda »Sendvič ELISA«

Vdolbinice MPL smo prekrili z lovilnimi anti-mišjimi IgG in IgM. Po inkubaciji smo nezasedena mesta blokirali s pufrom C. V naslednji stopnji smo na MPL nanesli ustrezno redčene vzorce in standarda IgG in IgM, po inkubaciji pa še detekcijska Abs, konjugirana s hrenovo preoksidazo. Ob dodatku substrata H₂O₂ pa so se vezani vzorci in standarda obarvali zeleno.

Sendvič ELISA-o smo opravili po enakem postopku kot posredno ELISA-o, le da smo:

- Vdolbinice prekrili z lovilnimi protitelesi Jackson® (c=1,7 µg/ml) v pufru A, 100 µl/vdolbinico; inkubacija čez noč pri +4 °C;
- Nanesli primerno redčene vzorce v pufru C (1. vdolbinica v koloni od 100 – 1000× redčenje, odvisno od vzorca, v ostalih 7 vdolbinicah v koloni 2× redčenje). Za standarde smo pripravili več redčitev za umeritveno krivuljo; 100 µl/vdolbinico, inkubiramo 90 min pri +37 °C;
- Po detekciji pa smo iz izmerjenih absorbanc in koncentracij standardov v programu MS Excel narisali umeritveni krivulji ter dobljeni enačbi premice uporabili za izračun koncentracij SN z mAbs razreda IgM in IgG.

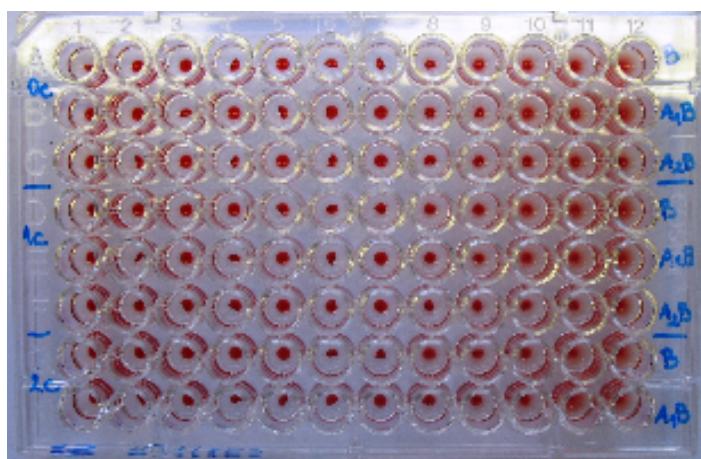
4. REZULTATI

4.1. POSPEŠENO STARANJE PRIPRAVLJENIH SUPERNATANTOV

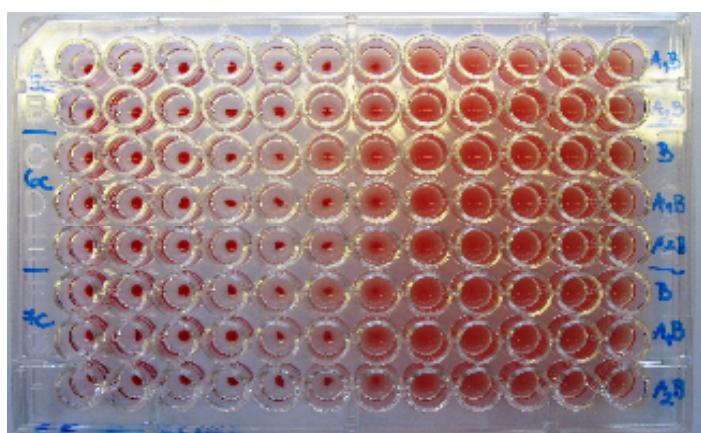
Ker smo med testiranjem ugotovili, da se rezultati med cikli pri posameznih SN ne razlikujejo bistveno, smo se zaradi večje preglednosti odločili, da v razpredelnici predstavimo le razlike med 0. in 7. ciklom z Erci A1 in A2B za SN a-A ter z Erci B in A2B za SN a-B.

Tudi v vseh nadaljnjih testiranjih smo iz istega vzroka uporabljali le vzorce 0. in 7. cikla.

4.1.1. Titer



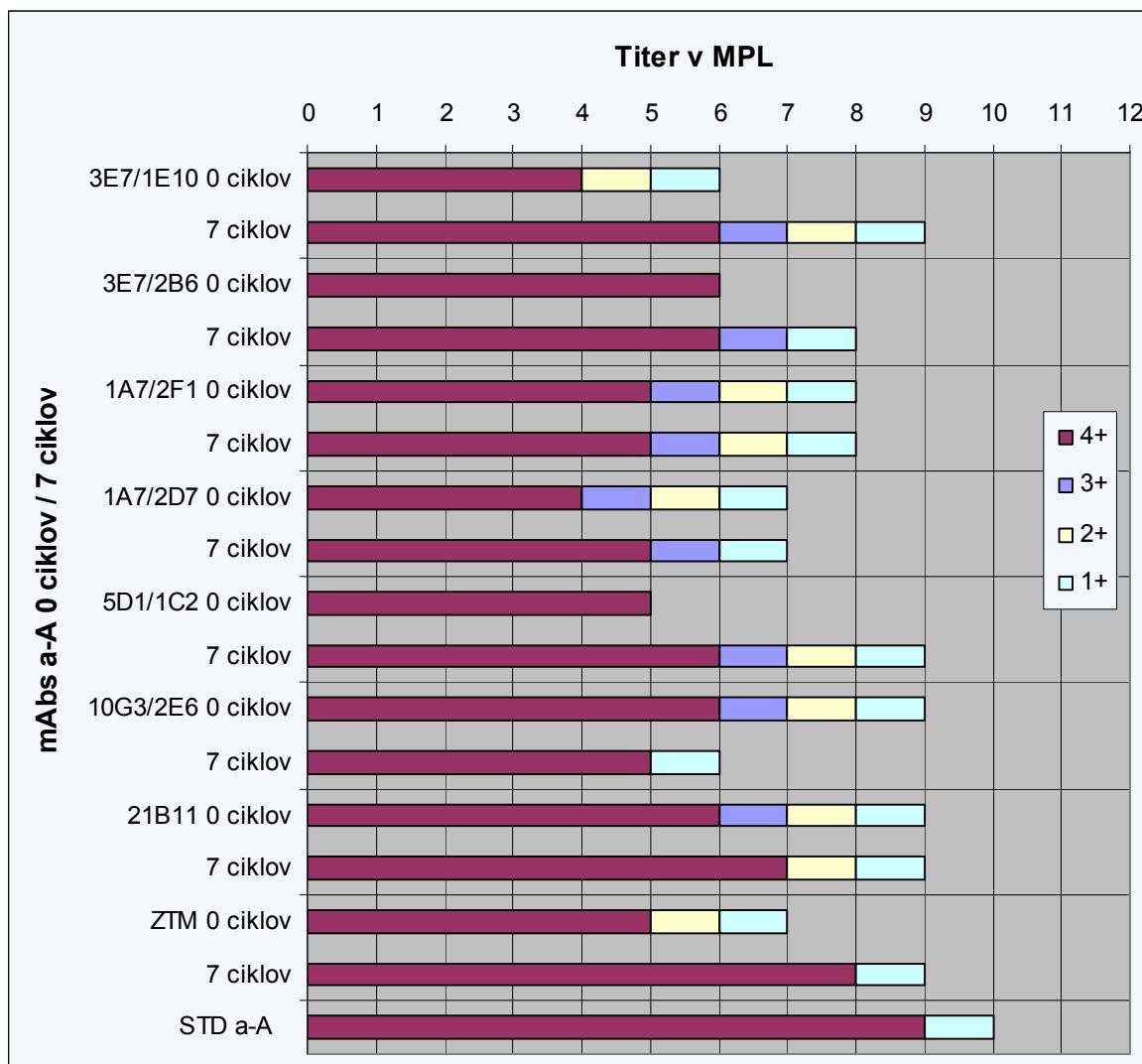
Slika 5: Ugotavljanje titra mAbs a-B specifičnosti v MPL; na levi je označen zaporedni cikel pri pospešenem staranju, na desni pa vrsta uporabljenih Erci – gre za mAbs z visokim titrom.



Slika 6: Ugotavljanje titra mAbs a-B specifičnosti v MPL; na levi je označen zaporedni cikel pri pospešenem staranju, na desni pa vrsta uporabljenih Erci – gre za mAbs z nižjim titrom.

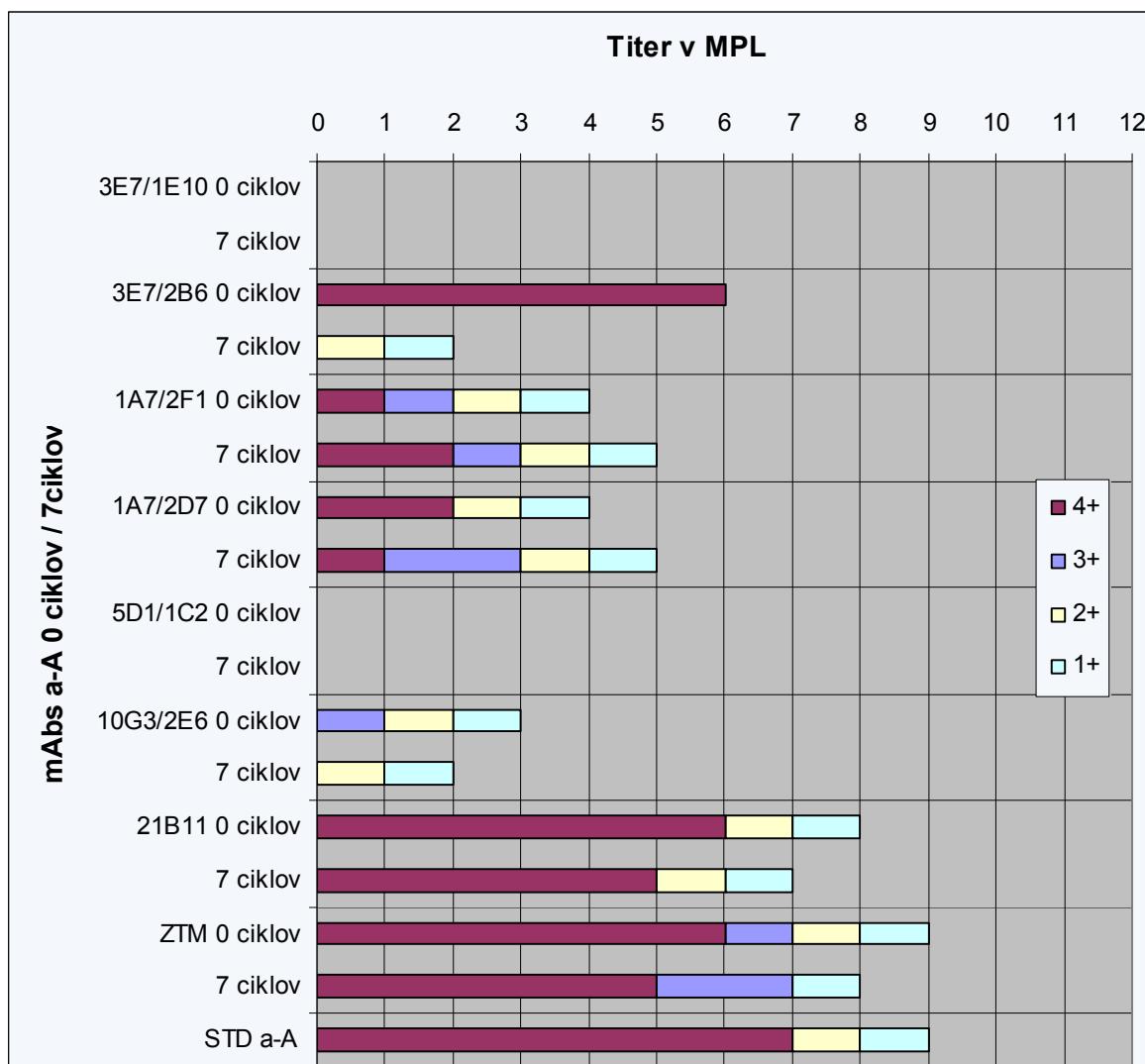
SN a-A

Graf 1: Titer mAbs v SN, a-A z Erci A1; nestaran SN (0. cikel), SN staran 7 ciklov.



Po 7. ciklu pospešenega staranja smo vsem mAbs, razen 10G3/2E6, določili nekoliko višji ali enak titer kot pred pospešenim staranjem.

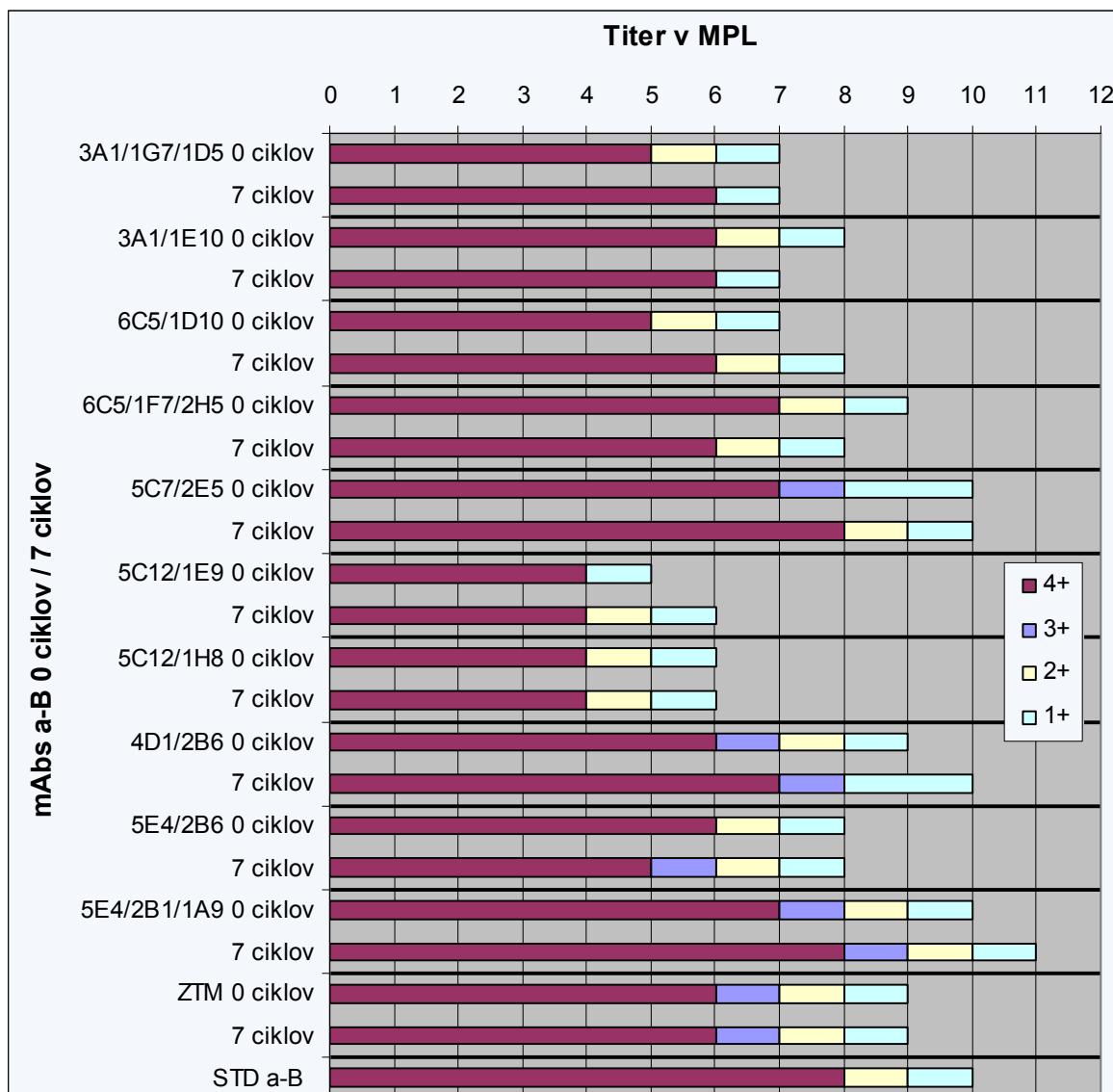
Graf 2: Titer mAbs v SN, a-A z Erci A2B; nestaran SN (0. cikel), SN staran 7 ciklov.



Titer mAbs z Erci A2B (šibki Erci) je bil pri skoraj vseh SN, razen pri 21B11, slab že pred začetkom pospešenega staranja. mAbs 21B11, ki pa so dobro aglutinirali tudi šibke Erci, so po pospešenem staranju obdržali to lastnost, titer je padel samo za eno redčenje.

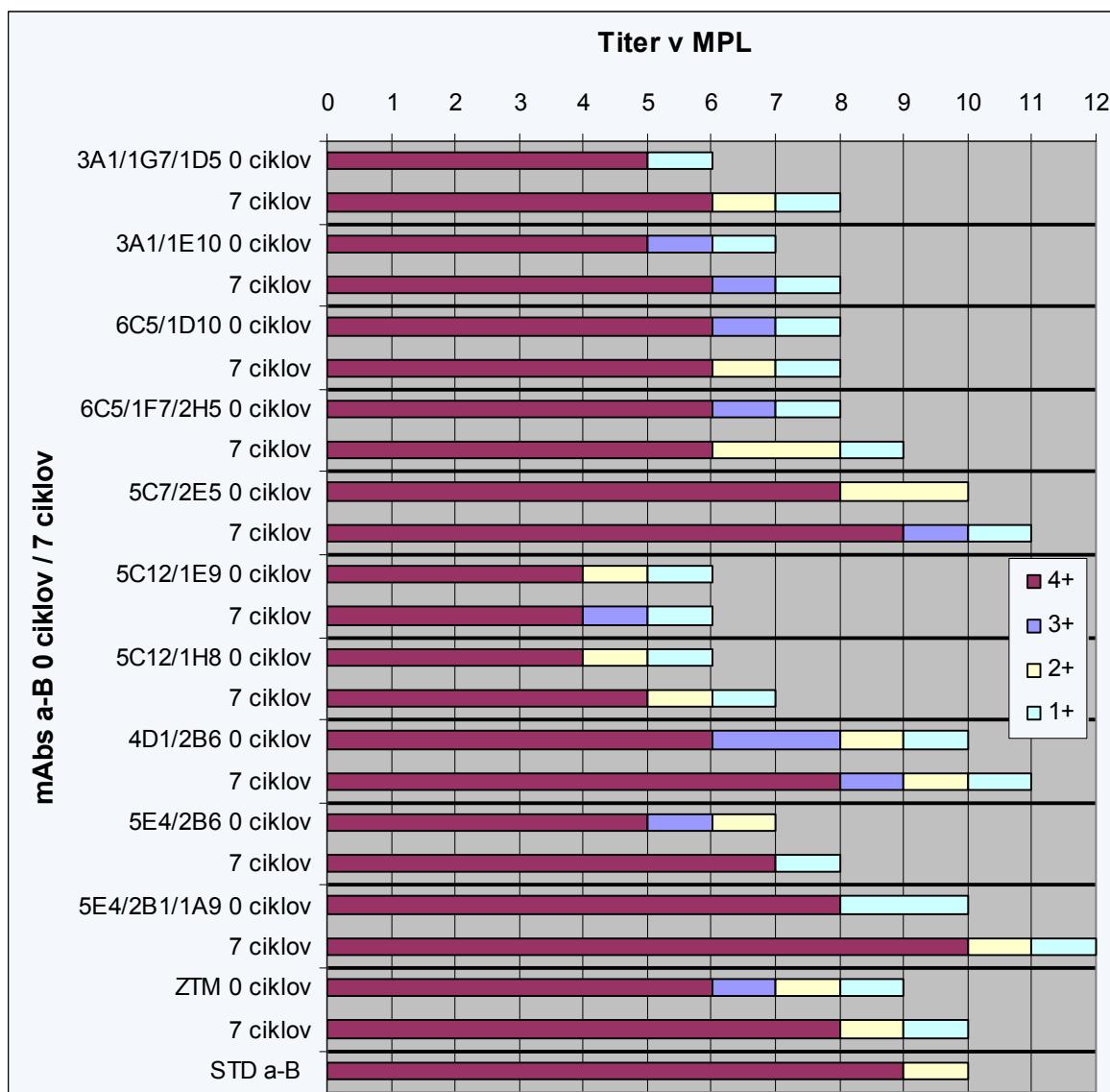
SN a-B

Graf 3: Titer mAbs v SN, a-B z Erci B; nestaran SN (0. cikel), SN staran 7 ciklov.



Po pospešenem staranju nismo opazili bistvenega poslabšanja titrov. Rezultati z Erci B in A2B so bili primerljivi.

Graf 4: Titer mAbs v SN, *a-B* z Erci *A2B*; nestaran SN (0. cikel), SN staran 7 ciklov.

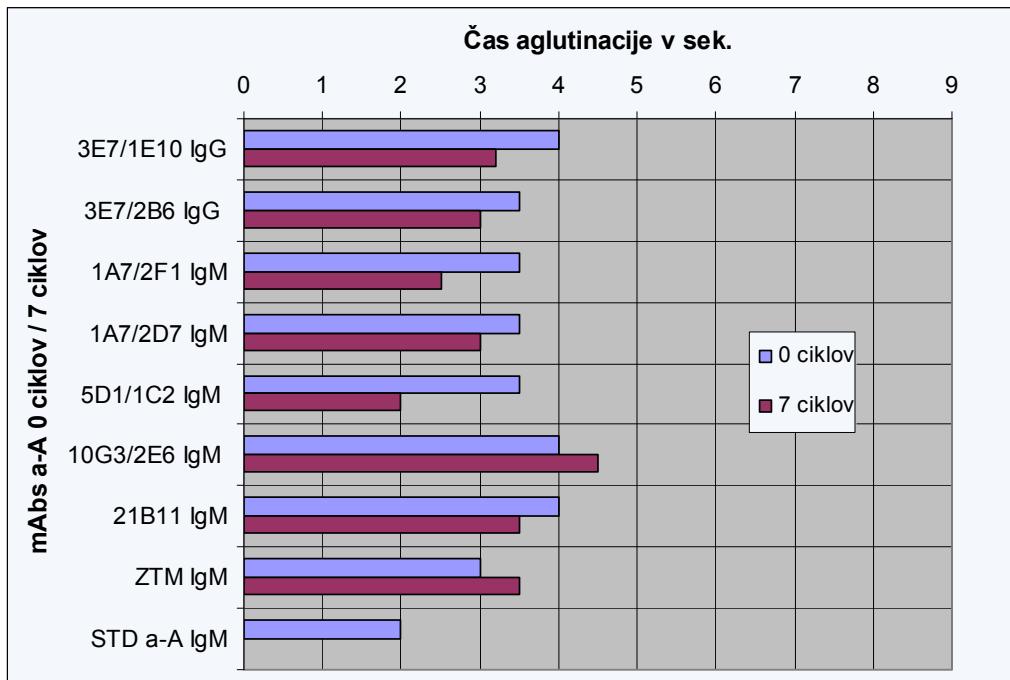


4.1.2. Čas aglutinacije

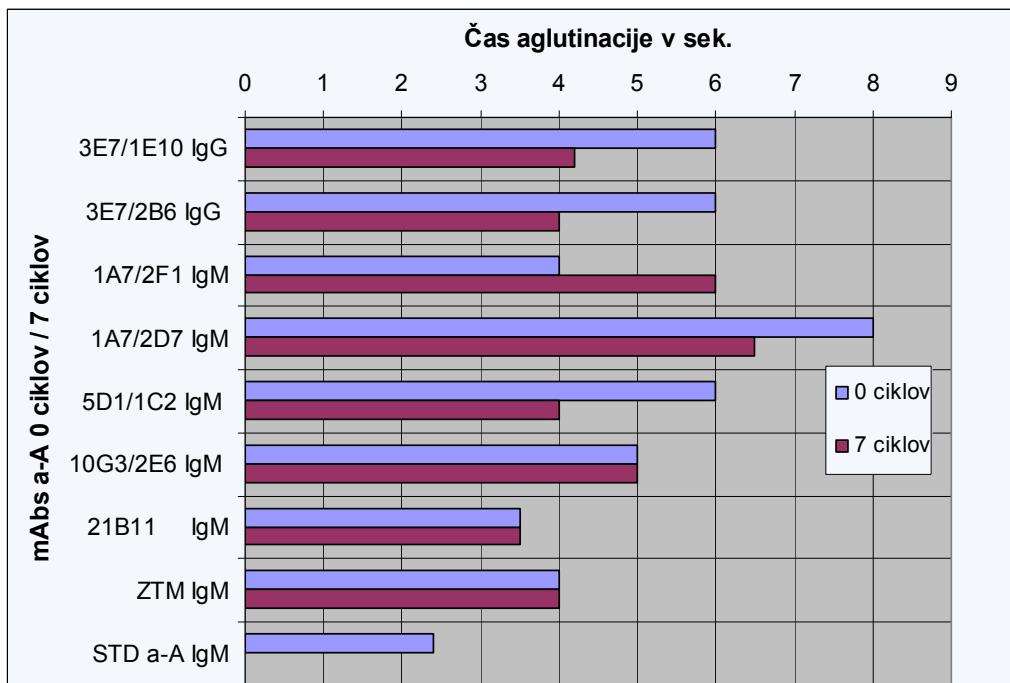
V grafih smo predstavili razlike med IgG in IgM razredi ter med 0. in 7. ciklom.

SN a-A

Graf 5: Čas aglutinacije mAbs v SN, *a-A* z Erci A1, 0. in 7. cikla.



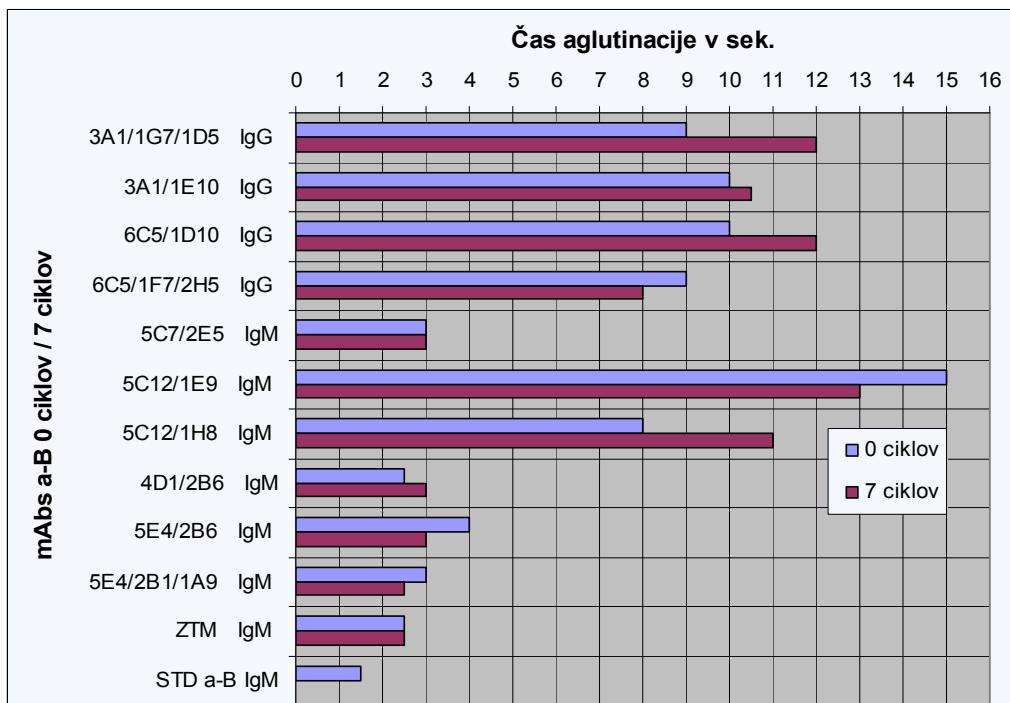
Graf 6: Čas aglutinacije mAbs v SN, *a-A* z Erci A2B, 0. in 7. cikla.



Čas aglutinacije je bil pri Erci A2B precej daljši kot pri Erci A1, bil pa je pri obeh Erci po pospešenem staranju nekoliko krajsi.

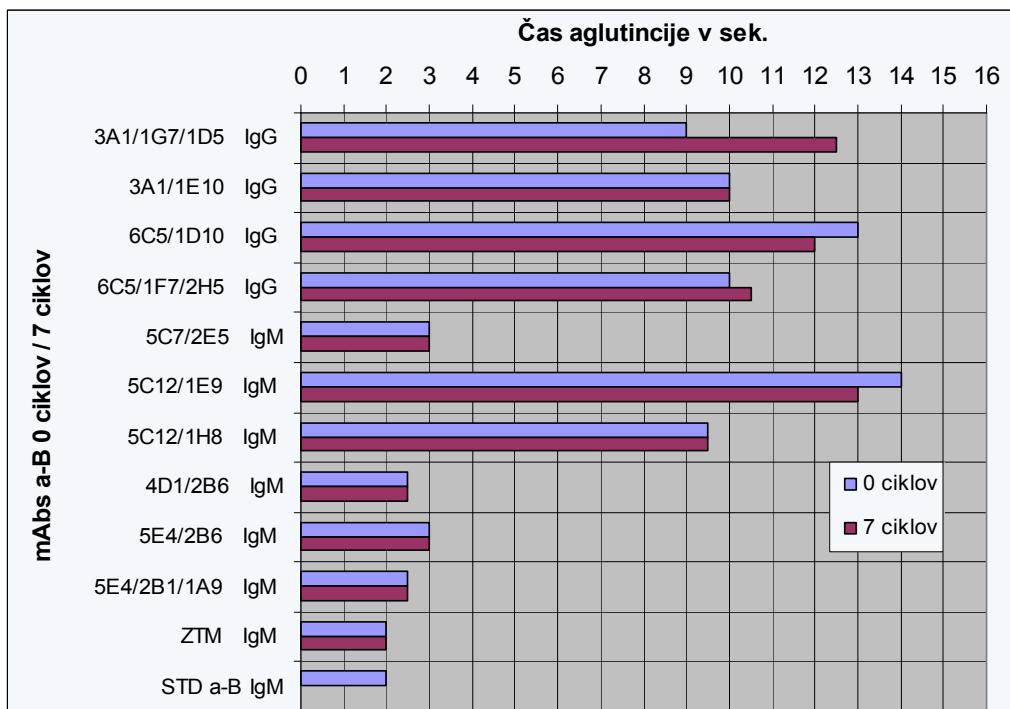
SN a-B

Graf 7: Čas aglutinacije mAbs v SN, a-B z Erci B, 0. in 7. cikla.



mAbs razreda IgG so imela precej daljši čas aglutinacije kot IgM, kar pri SN a-A nismo opazili. Tu sta izstopali dve celični liniji mAbs razreda IgM, ki sta imeli precej daljši čas aglutinacije, to sta bili 5C12/1E9 in 5C12/1H8. Rezultati pri Erci B in A2B so bili primerljivi med seboj.

Graf 8: Čas aglutinacije mAbs v SN, a-B z Erci A2B, 0. in 7. cikla.



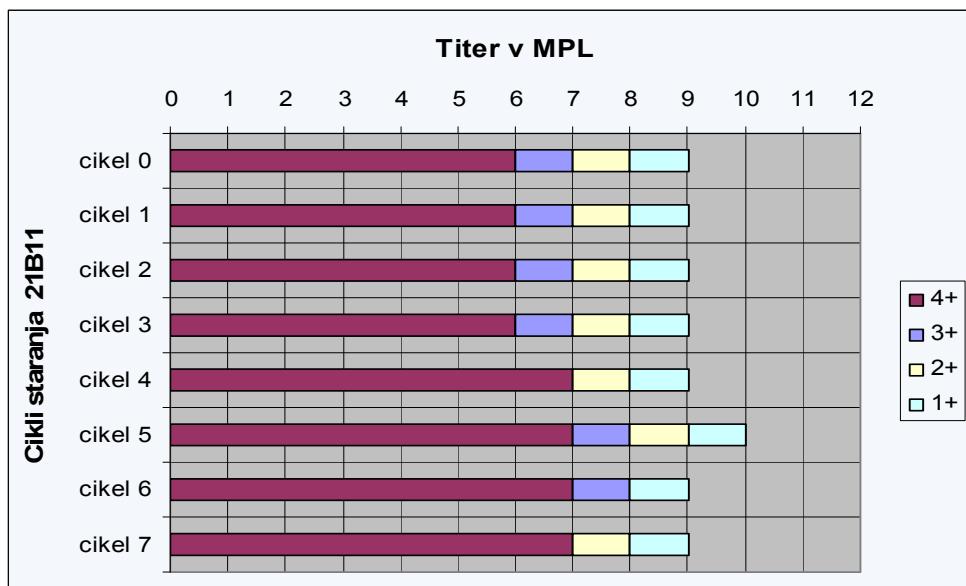
4.1.3. Pospešeno staranje izbranih supernatantov

Zaradi velike količine podatkov smo se odločili, da podrobneje predstavimo nekaj izbranih primerov. Izmed SN, ki vsebujejo mAbs a-A, smo izbrali 21B11, ki spadajo v razred IgM, ter 3E7/2B6, ki spadajo v razred IgG. Pri SN a-B pa smo izbrali 4D1/2B6 iz razreda IgM in 3A1/1E10 iz razreda IgG.

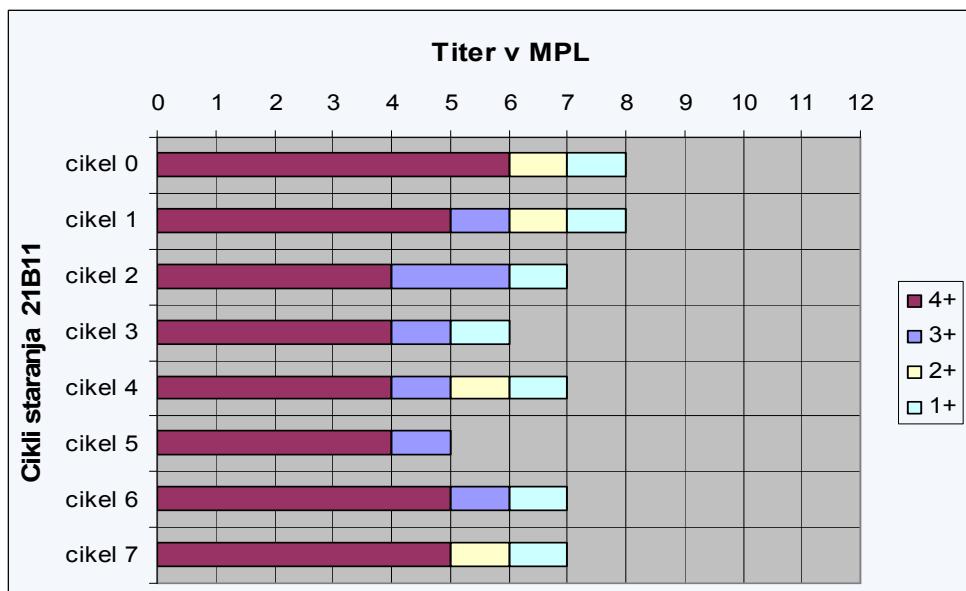
SN a-A

21B11 IgM

Graf 9: Titri mAbs *21B11* z Erci *A1* po posameznih ciklih.



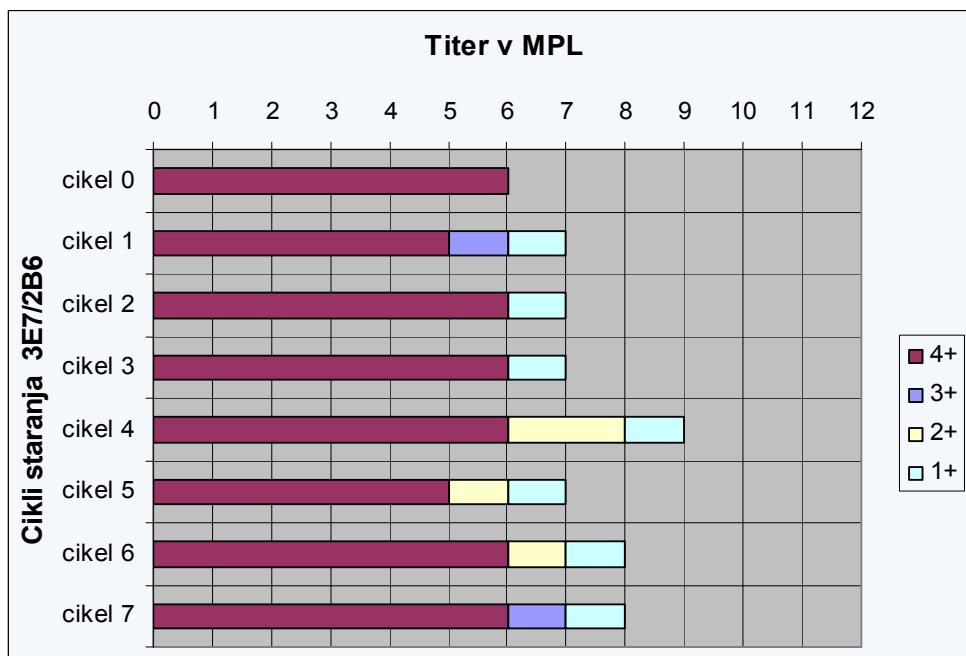
Graf 10: Titri mAbs *21B11* z Erci *A2B* po posameznih ciklih.



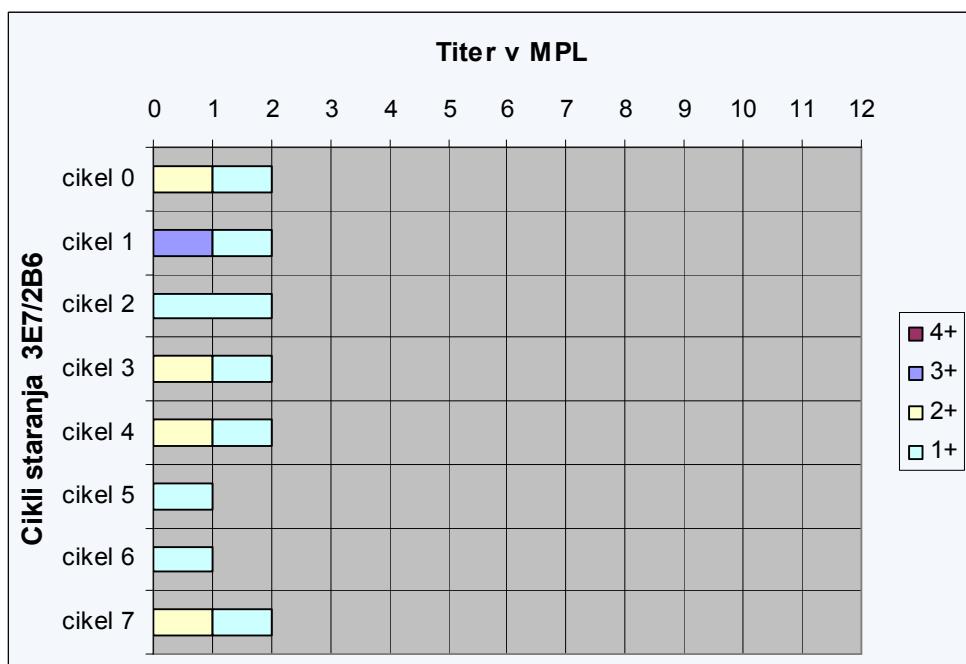
Po sedmih ciklih staranja je bil titer z Erci A1 boljši kot pred staranjem, z Erci A2B pa za eno redčitev slabši, kar smo pričakovali, saj so Erci A2B šibkejši.

3E7/2B6 IgG

Graf 11: Titri mAbs *3E7/2B6* z Erci *A1* po posameznih ciklih.



Graf 12: Titri mAbs *3E7/2B6* z Erci *A2B* po posameznih ciklih.

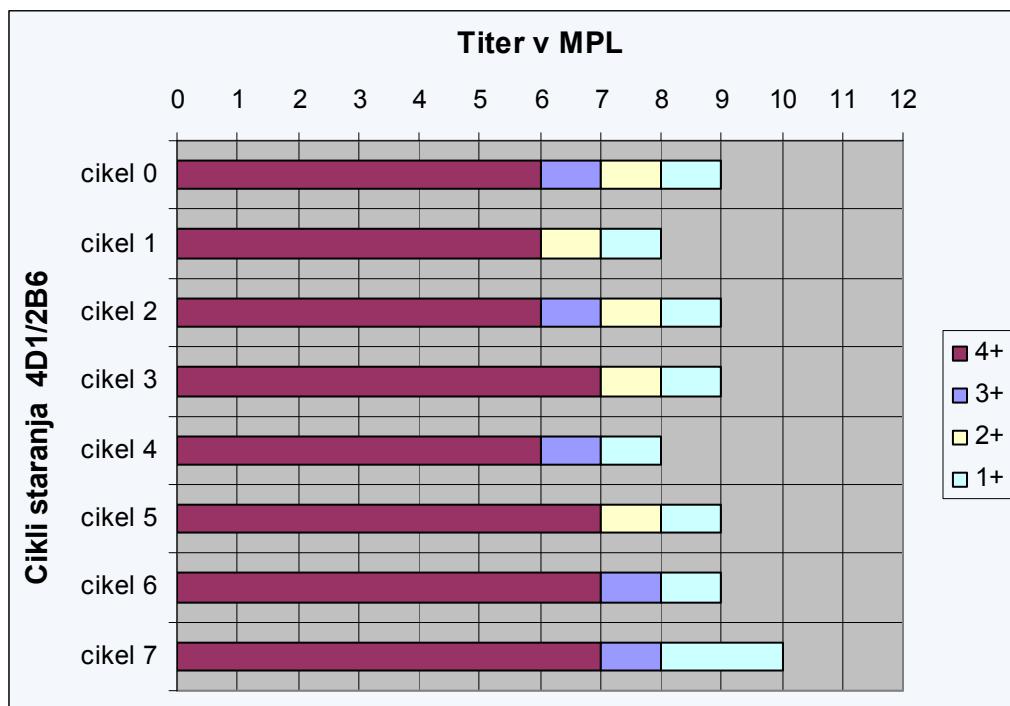


Po pospešenem staranju se titri niso spremenili bistveno, niti pri Erci A2B, kljub temu, da so nizki.

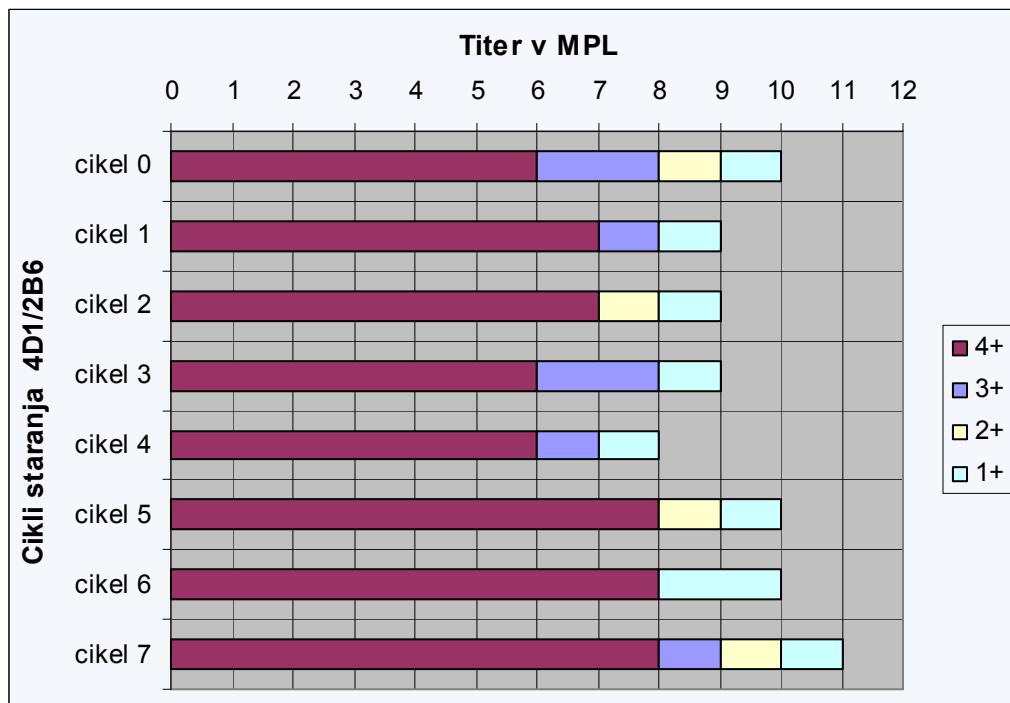
SN a-B

4D1/2B6 IgM

Graf 13: Titri mAbs *4D1/2B6* z Erci *B* po posameznih ciklih.



Graf 14: Titri mAbs *4D1/2B6* z Erci *A2B* po posameznih ciklih.



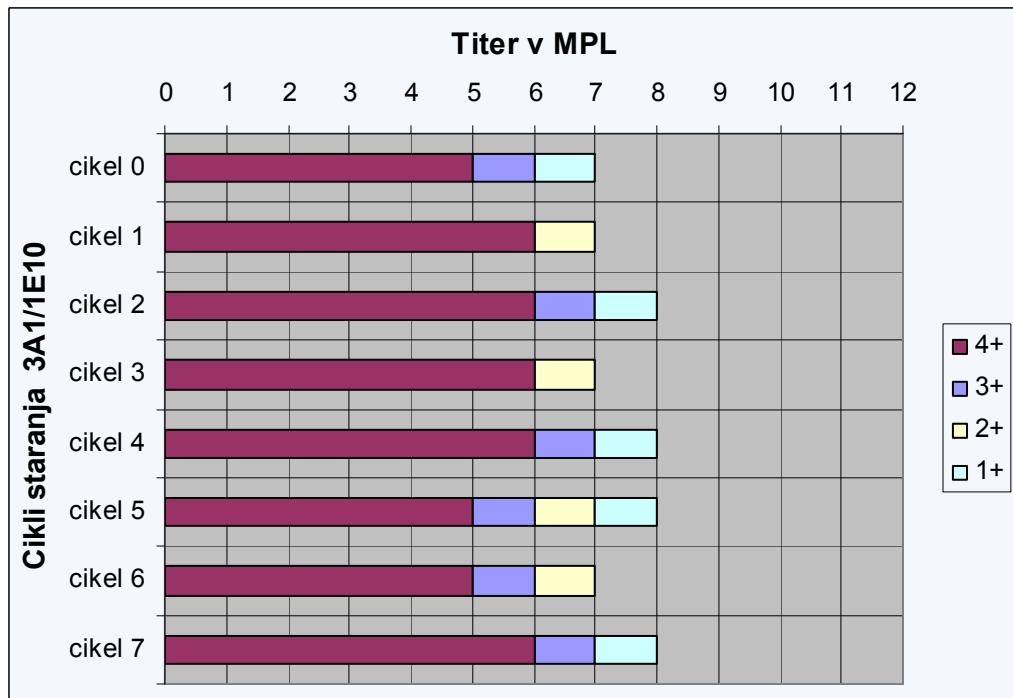
Titer je po pospešenem staranju ostal približno enak tako pri Erci *B* kot pri *A2B*.

3A1/1E10 IgG

Graf 15: Titri mAbs 3A1/1E10 z Erci B po posameznih ciklih.



Graf 16: Titri mAbs 3A1/1E10 z Erci A2B po posameznih ciklih.



Titer je po pospešenem staranju ostal približno enak pri obojih Erci.

4.2. STARANJE SUPERNATANTOV PRI +55 °C

4.2.1. Titer

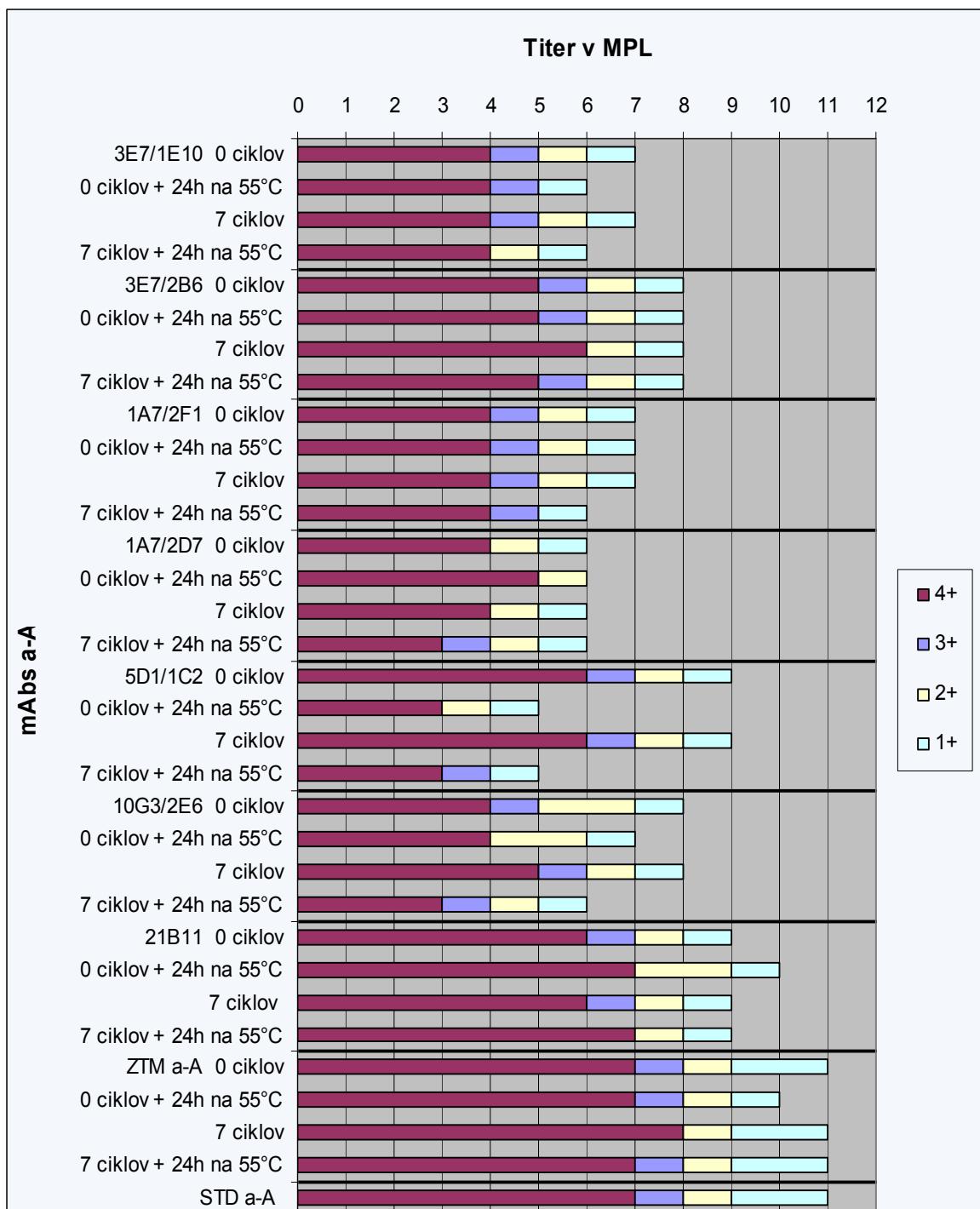
Zaradi velike količine podatkov in ker so se pri večini naših SN bistvene spremembe dogajale šele po 24-urnem segrevanju, smo se odločili v graffih predstaviti le titre mAbs SN 0. cikla, ki so bili vse čas shranjeni v hladilniku pri +4 °C, in SN 0. cikla, ki smo jih starali 24 h pri +55 °C, ter 7. cikla, ki so bili prav tako vse do testiranja shranjeni v hladilniku pri +4 °C, ter SN 7. cikla, ki smo jih starali 24 ur pri +55 °C.

Tabela IV: Pomen oznak v graffih titrov po staranju pri +55 °C.

0 ciklov	0. cikel do testiranja hranjen v hladilniku
0 ciklov + 24 h na +55 °C	0. cikel 24 h staran pri +55 °C
7 ciklov	7. cikel do testiranja hranjen v hladilniku
7 ciklov + 24 h na +55 °C	7. cikel 24 h staran pri +55 °C

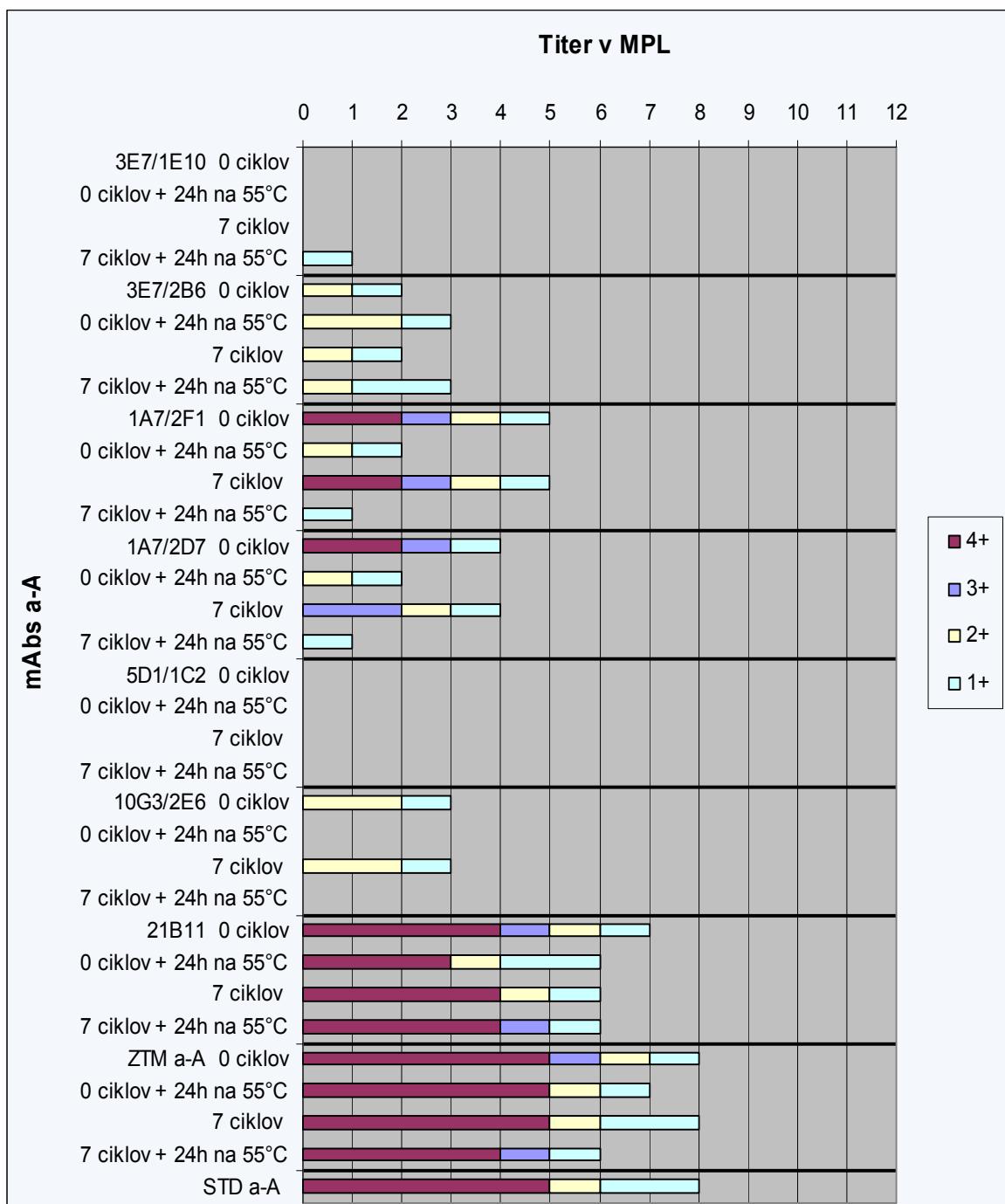
SN a-A

Graf 17: Titri mAbs SN a-A pred in po staranju pri +55 °C z Erci A1.



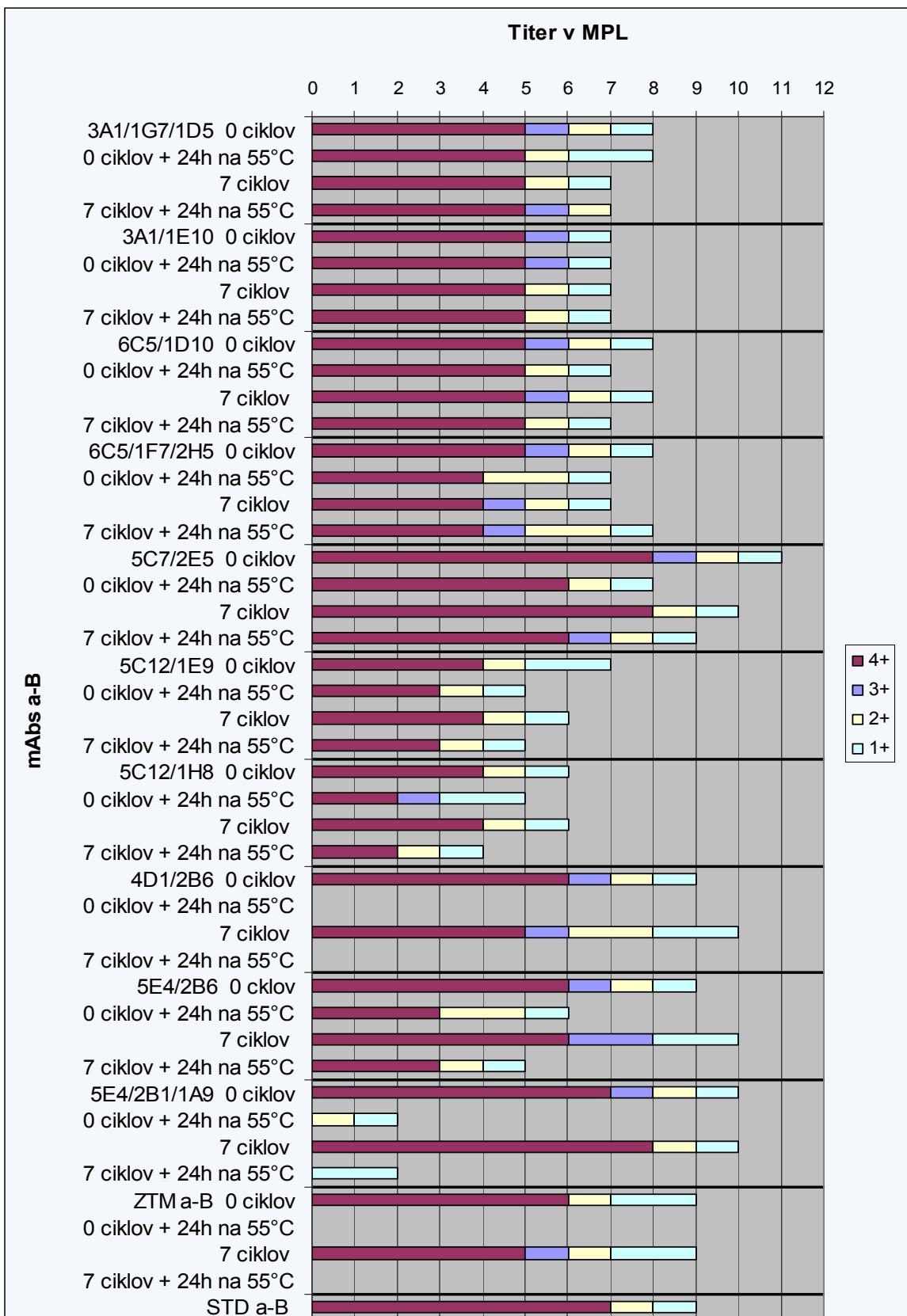
Po staranju pri +55 °C je bistveno padel le titer mAbs 5D1/1C2.

Graf 18: Titri mAbs SN a-A pred in po staranju pri +55 °C z Erci A2B.



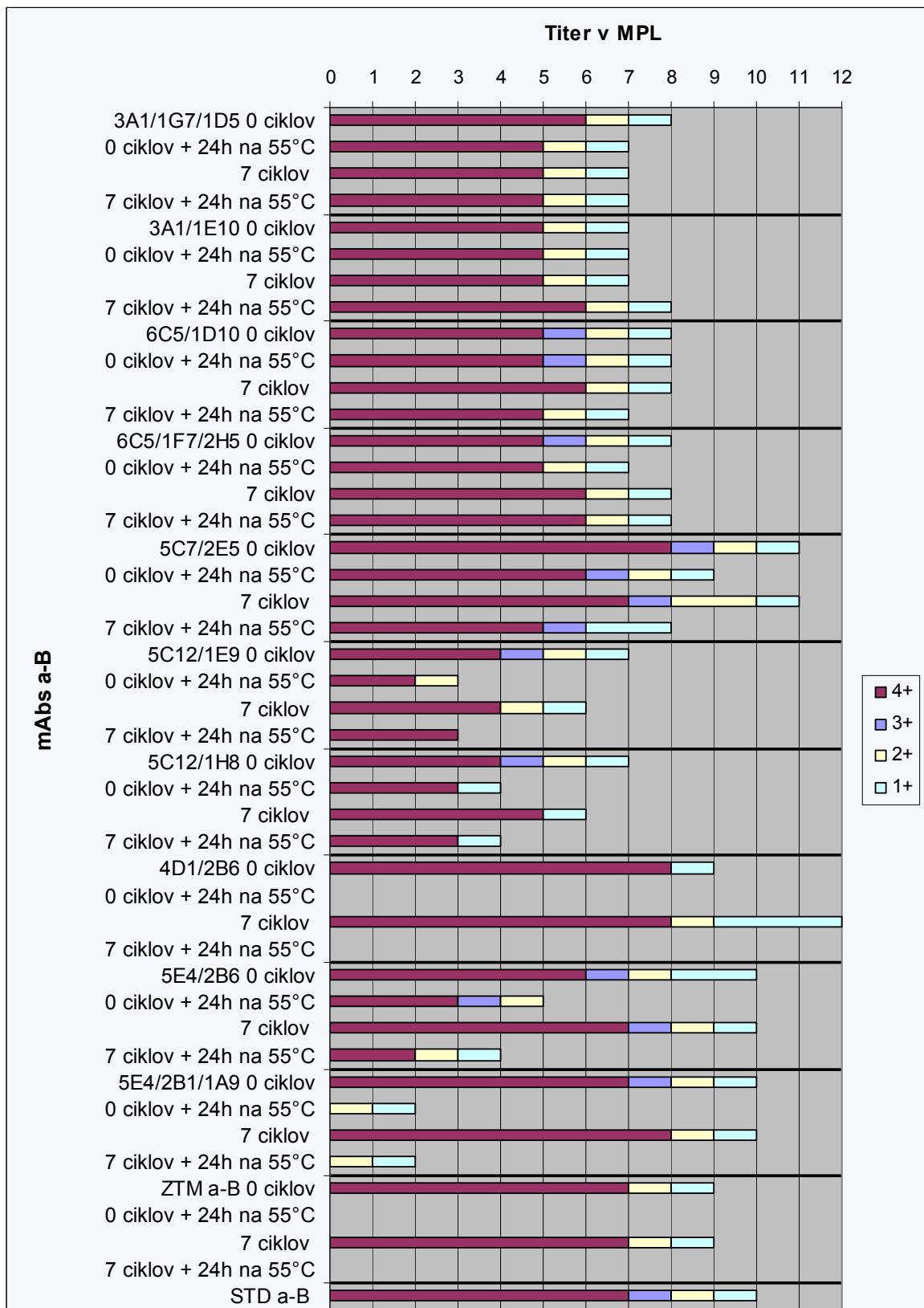
SN a-B

Graf 19: Titri mAbs SN a-B pred in po staranju pri +55 °C z Erci B.



Po 24-urnem staranju pri +55 °C je bil rezultat negativen pri mAbs 4D1/2B6 in a-B ZTM.

Graf 20: Titri mAbs SN *a-B* pred in po staranju pri +55 °C z Erci A2B.



Rezultati z Erci B in A2B so bili primerljivi.

4.2.2. Čas aglutinacije

Primerjali smo čase aglutinacije med mAbs v SN 0. cikla, ki je bil hranjen v hladilniku pri +4 °C in mAbs v SN 0. cikla staranim 24 ur pri +55 °C ter mAbs v SN 7. cikla, ki je bil po pospešenem staranju do testiranja ves čas v hladilniku pri +4 °C in mAbs v SN 7. cikla, ki je bil 24 ur staran pri +55 °C.

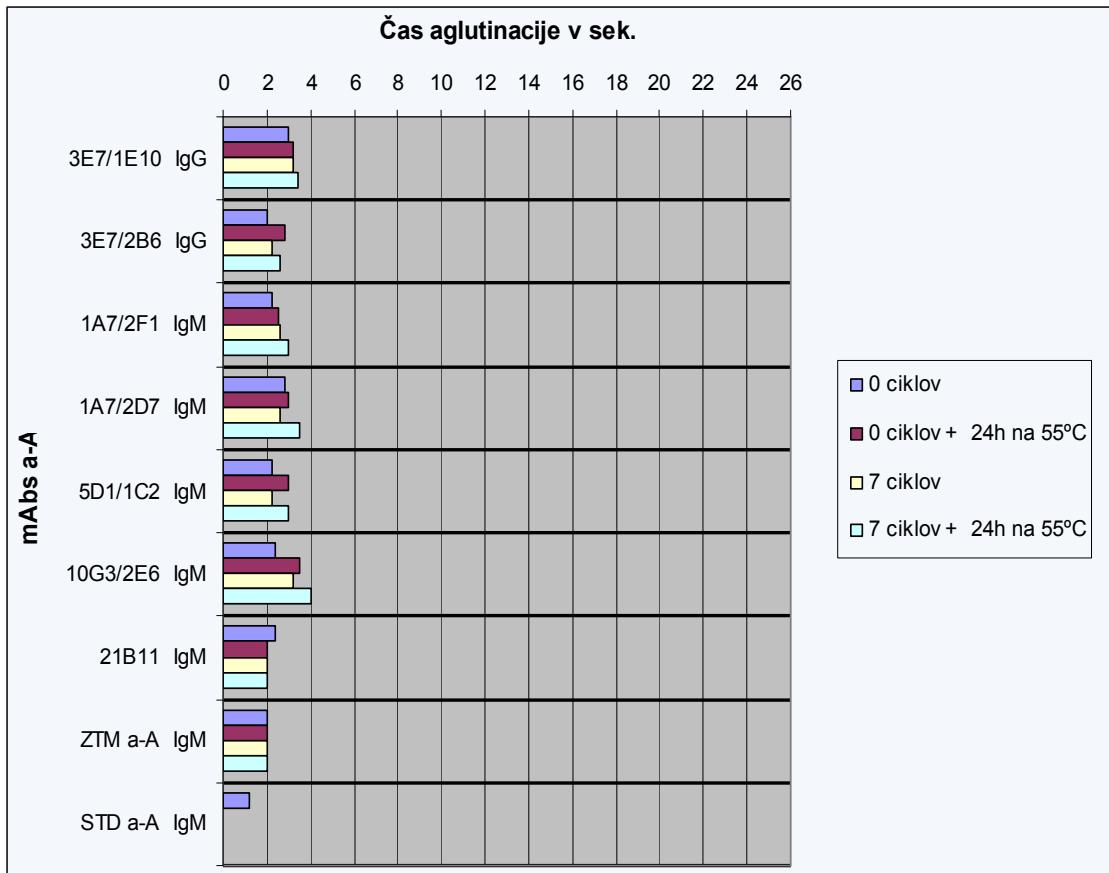
V grafih nismo predstavili rezultatov staranj vmesnih časov, torej po 2, 4, 6 ali 8 urah zaradi večje preglednosti in ker so bistvene spremembe postale vidne šele po 24-urnem segrevanju.

Tabela V: Pomen oznak v grafih s časi aglutinacije po staranju pri +55 °C.

0 ciklov	0. cikel do testiranja hranjen v hladilniku
0 ciklov + 24h pri +55 °C	0. cikel 24 h staran pri +55 °C
7 ciklov	7. cikel do testiranja hranjen v hladilniku
7 ciklov + 24h pri +55 °C	7. cikel 24 h staran pri +55 °C

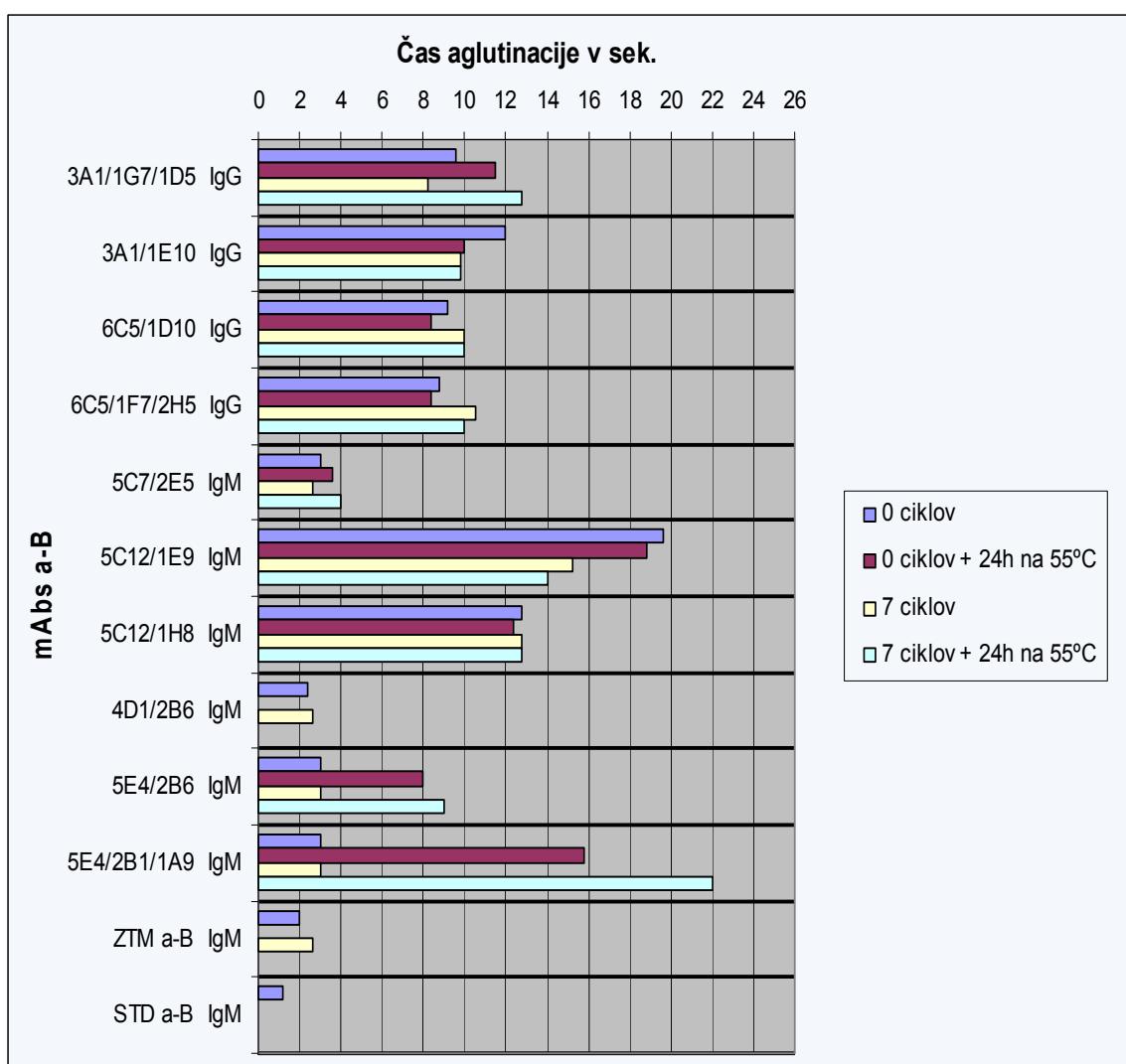
SN a-A

Graf 21: Čas aglutinacije mAbs v SN a-A, z Erci A1, pred in po staranju pri +55 °C.



SN a-B

Graf 22: Čas aglutinacije mAbs v SN a-B, z Erci B, pred in po staranju pri +55 °C.



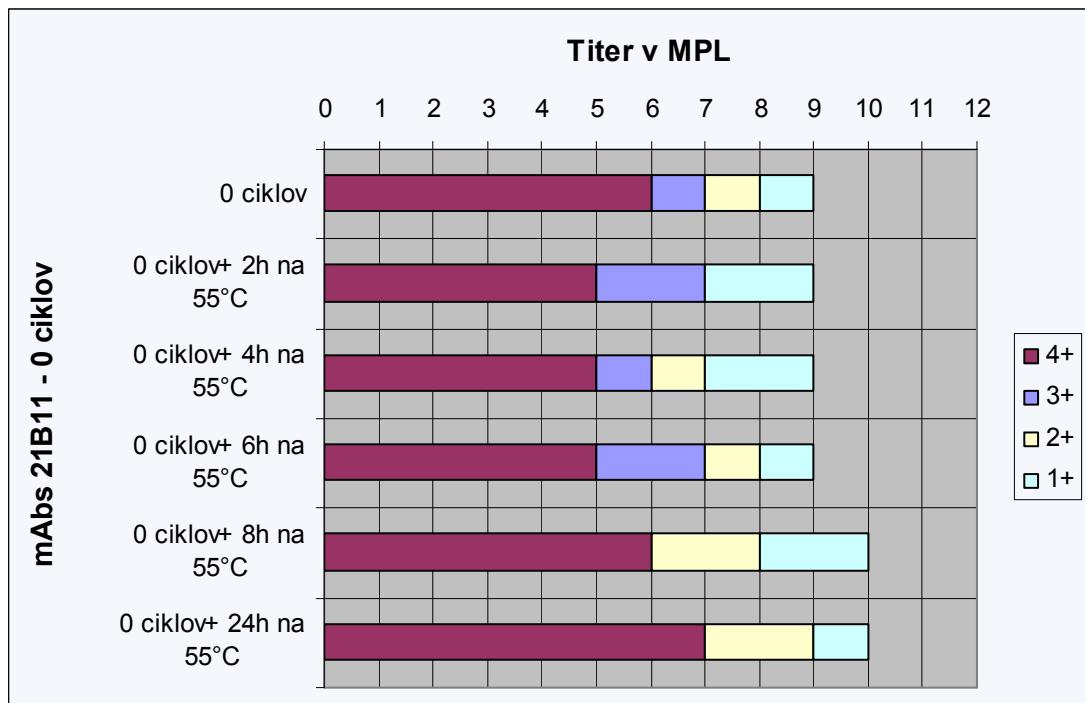
Čas aglutinacije se je po segrevanju pri +55 °C bistveno podaljšal le pri mAbs 5E4/2B6 in 5E4/2B1/1A9.

4.2.3. Staranje izbranih supernatantov pri +55 °C

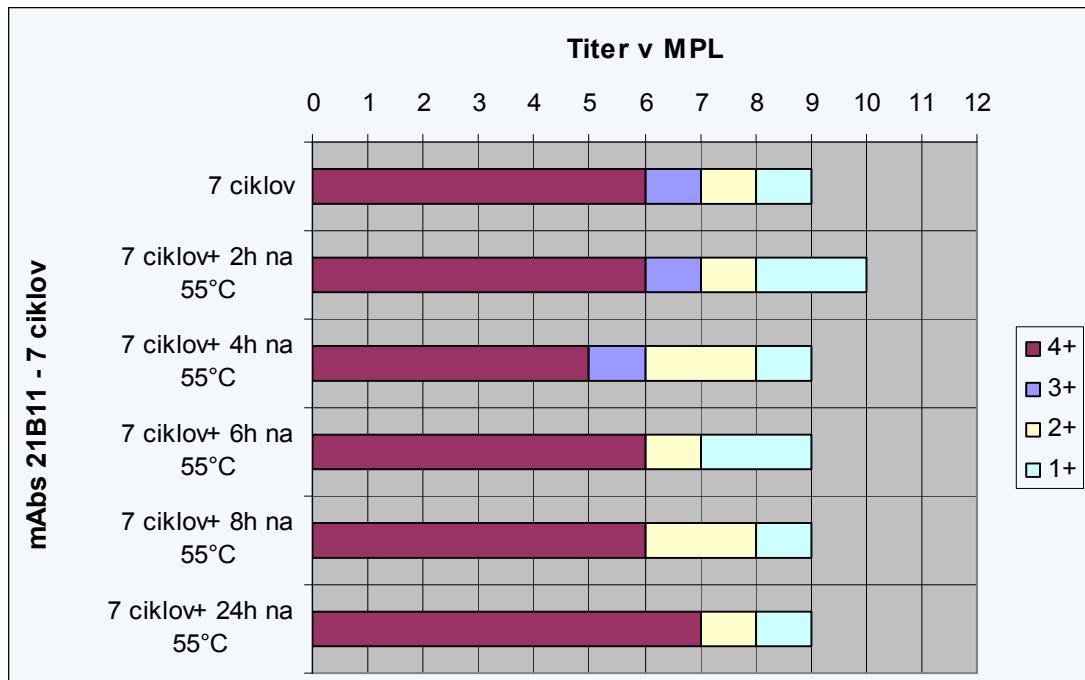
SN a-A

21B11 IgM

Graf 23: Titri (z Erci A1) mAbs SN 21B11 – 0. cikel, ki smo ga starali pri +55 °C 2, 4, 6, 8 ali 24 ur.

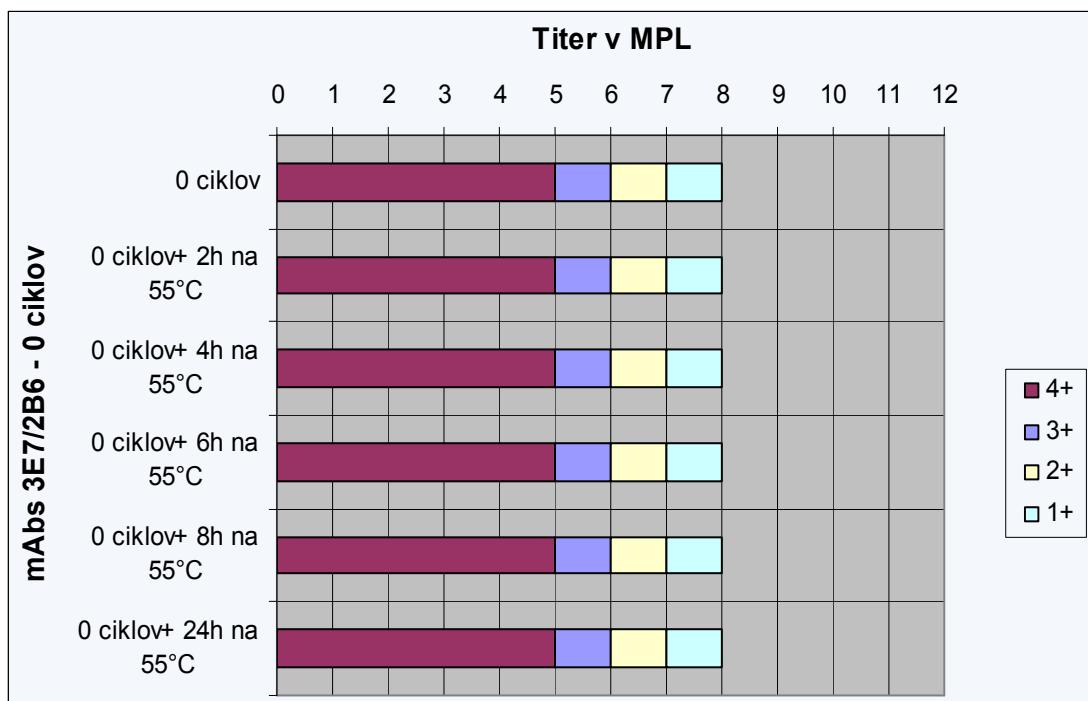


Graf 24: Titri (z Erci A1) mAbs SN 21B11 – 7. cikel, ki smo ga starali pri +55 °C 2, 4, 6, 8 in 24 ur.

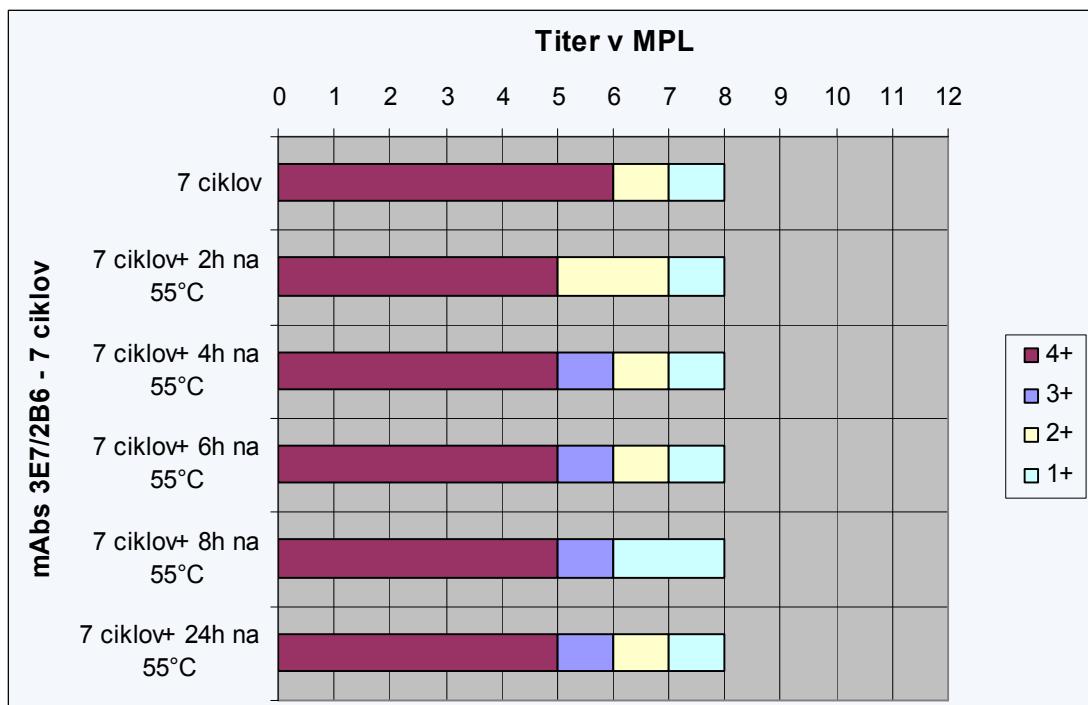


3E7/2B6 IgG

Graf 25: Titri (z Erci A1) mAbs SN 3E7/2B6 – 0. cikel, ki smo ga starali pri +55 °C 2, 4, 6, 8 in 24 ur.



Graf 26: Titri (z Erci A1) mAbs SN 3E7/2B6 – 7. cikel, ki smo ga starali pri +55 °C 2, 4, 6, 8 in 24 ur.

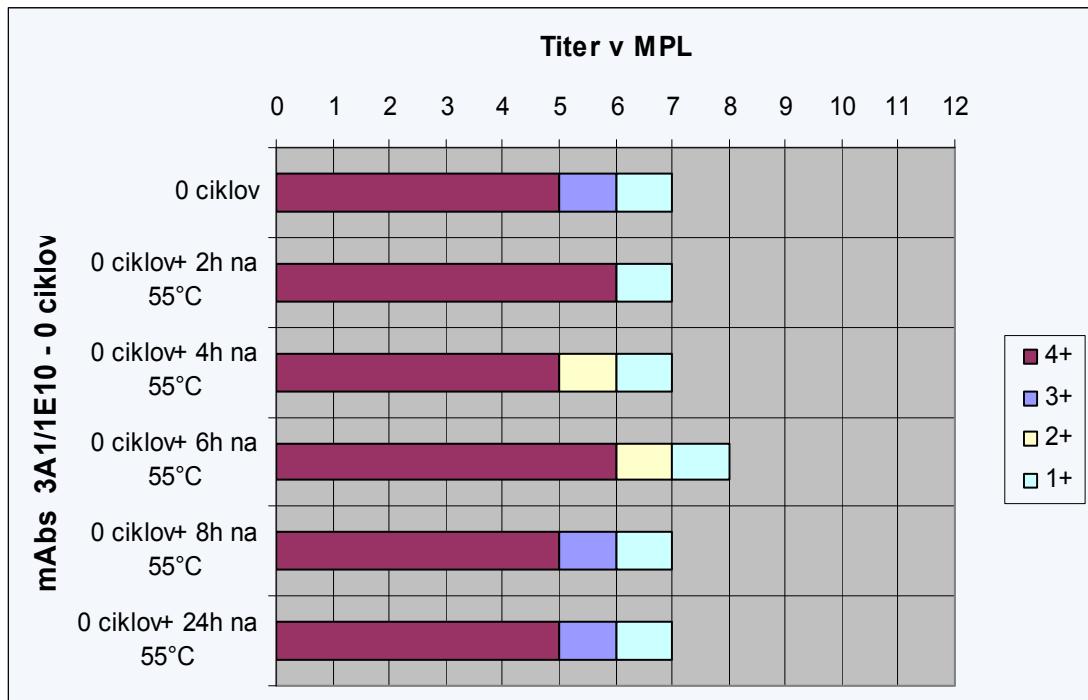


Pri vseh SN a-A so titri po staranju pri +55 °C ostali nespremenjeni.

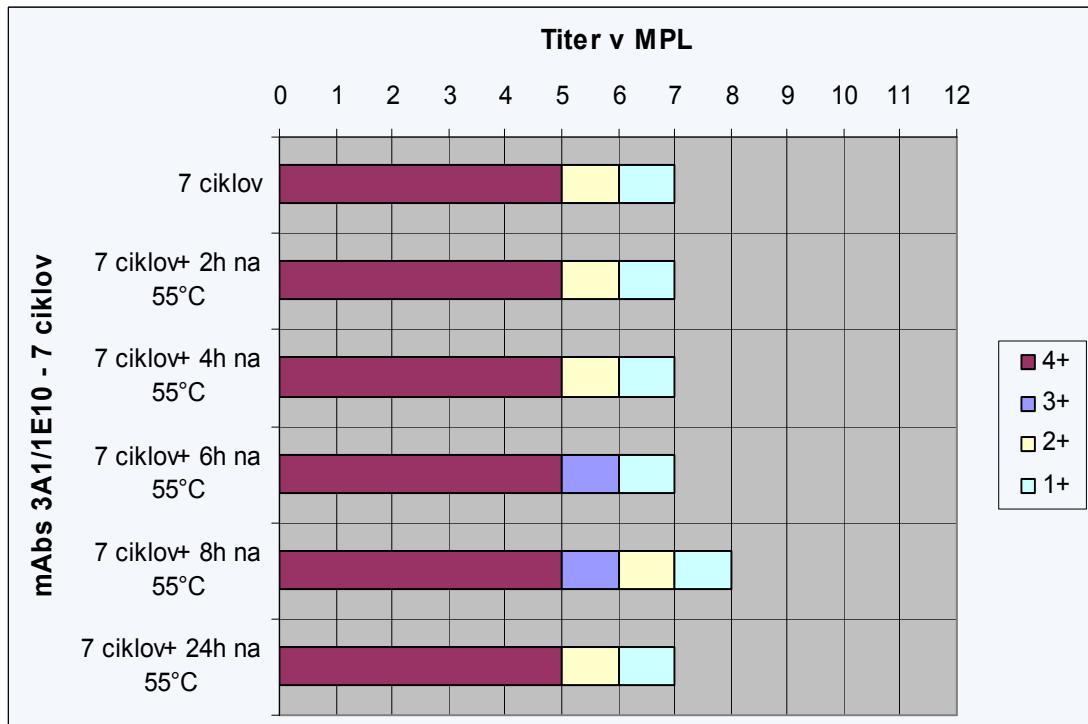
SN a-B

3A1/1E10 IgG

Graf 27: Titri (z Erci B) mAbs SN 3A1/1E10 – 0. cikel, ki smo ga starali pri +55 °C 2, 4, 6, 8 in 24 ur.

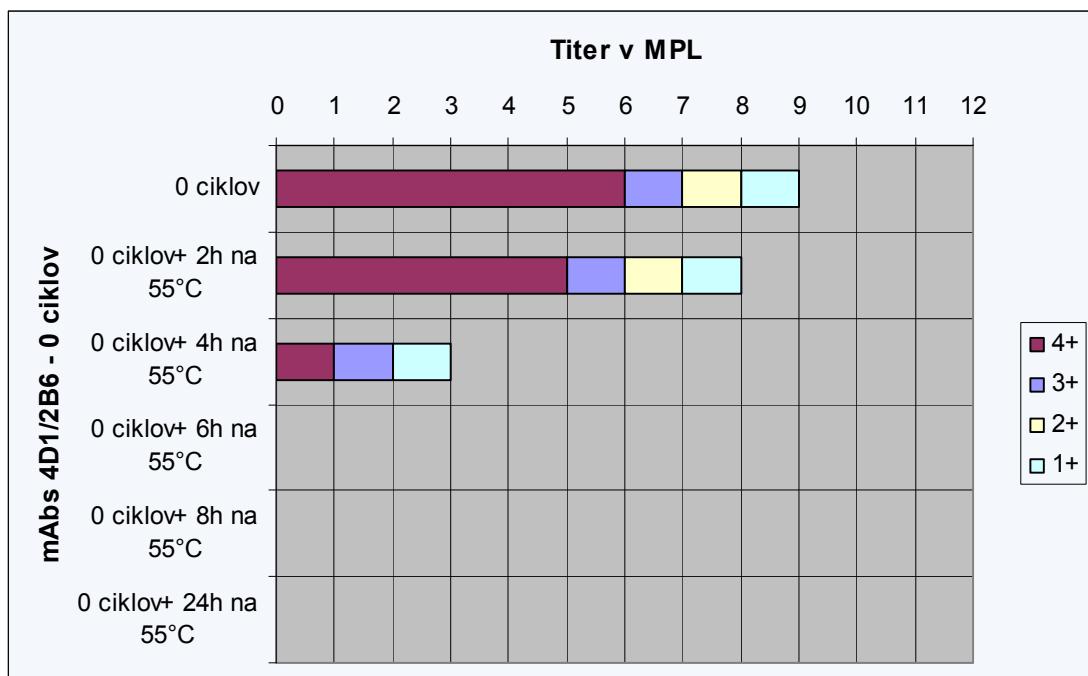


Graf 28: Titri (z Erci B) mAbs SN 3A1/1E10 – 7. cikel, ki smo ga starali pri +55 °C 2, 4, 6, 8 in 24 ur.

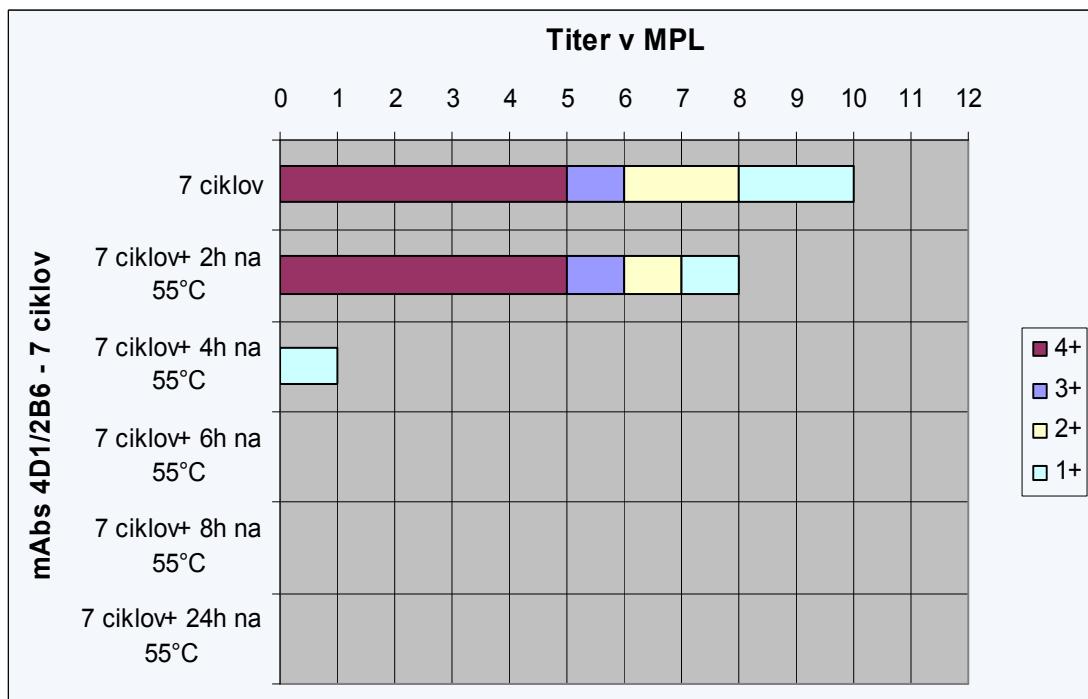


4D1/2B6 IgM

Graf 29: Titri (z Erci B) mAbs SN 4D1/2B6 – 0. cikel, ki smo ga starali pri +55 °C 2, 4, 6, 8 in 24 ur.



Graf 30: Titri (z Erci B) mAbs SN 4D1/2B6 – 7. cikel, ki smo ga starali pri +55 °C 2, 4, 6, 8 in 24 ur.



Po 4 urah mAbs 4D1/2B6 niso dala več pozitivne reakcije, tako pri 0. kot pri 7. ciklu z Erci B.

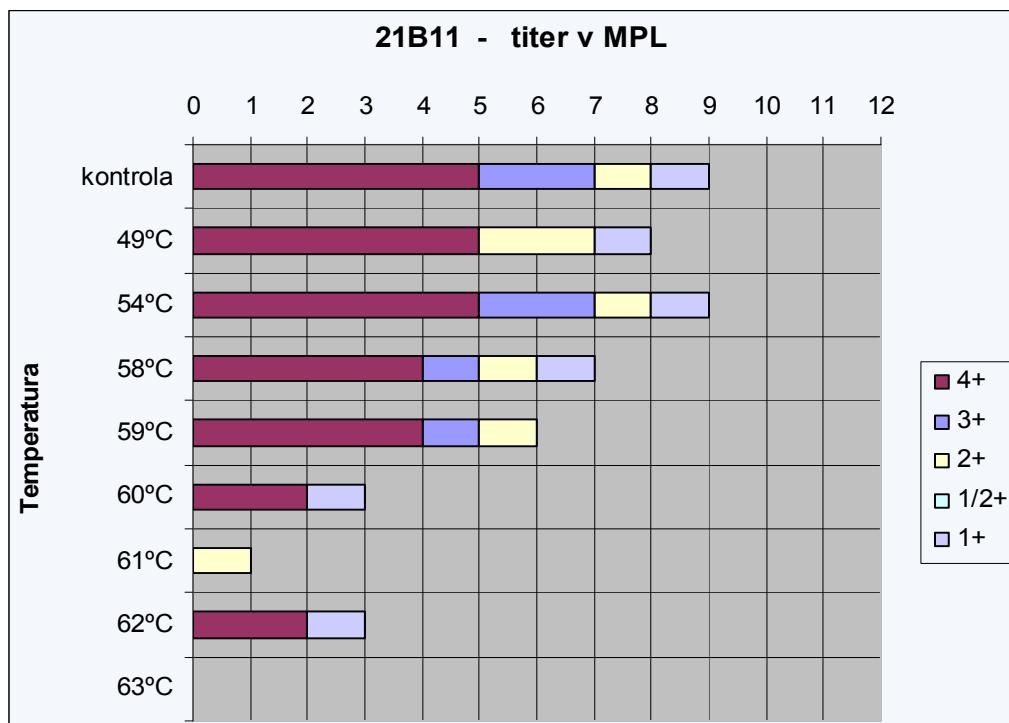
4.3. TEMPERATURNA TOČKA STABILNOSTI

Kontrola v tem poglavju pomeni, da je SN nestaran, nesegret in do testiranja hransen v hladilniku pri +4 °C.

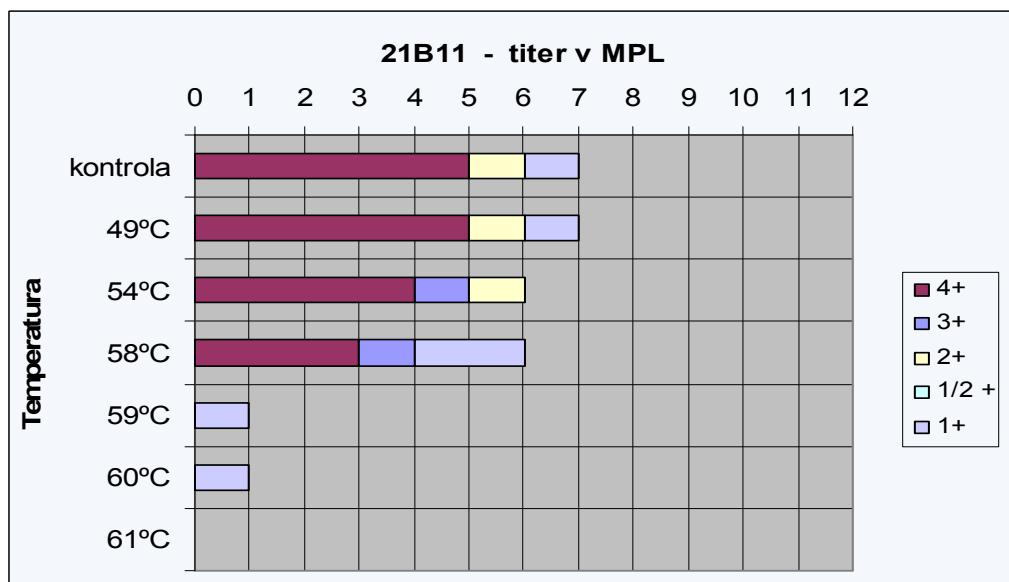
SN a-A

21B11 IgM

Graf 31: Padec titra z višanjem temperature, a-A, Erci A1.



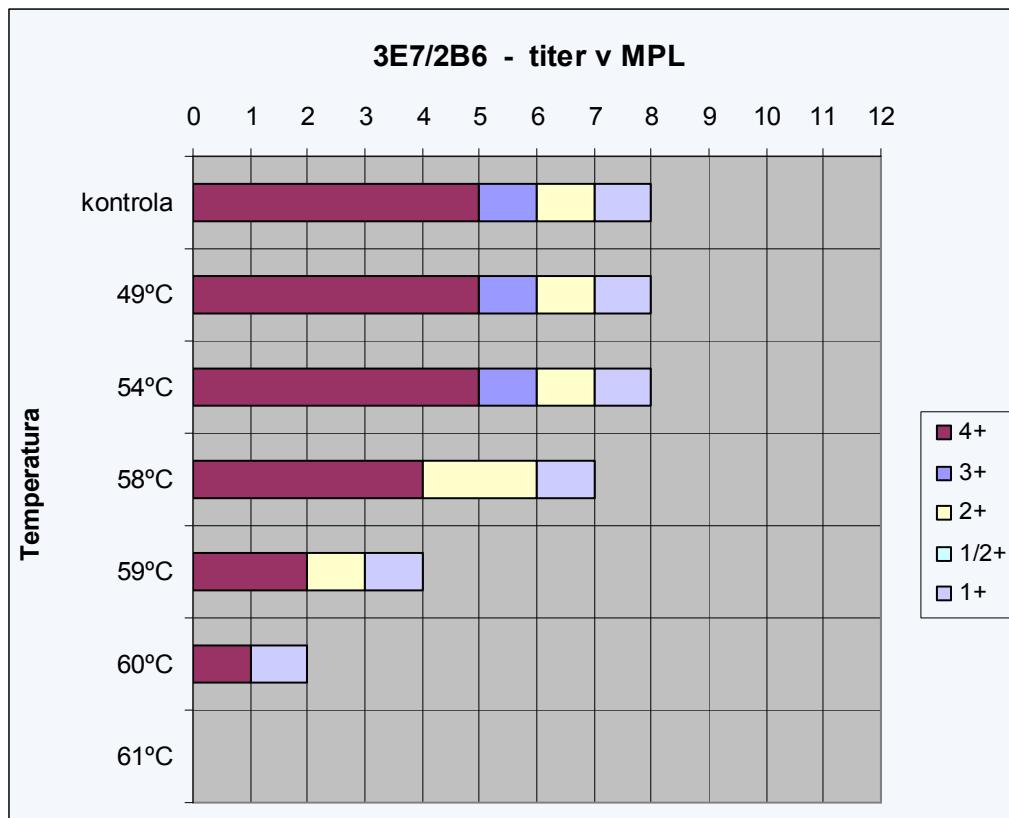
Graf 32: Padec titra z višanjem temperature, a-A, Erci A2B.



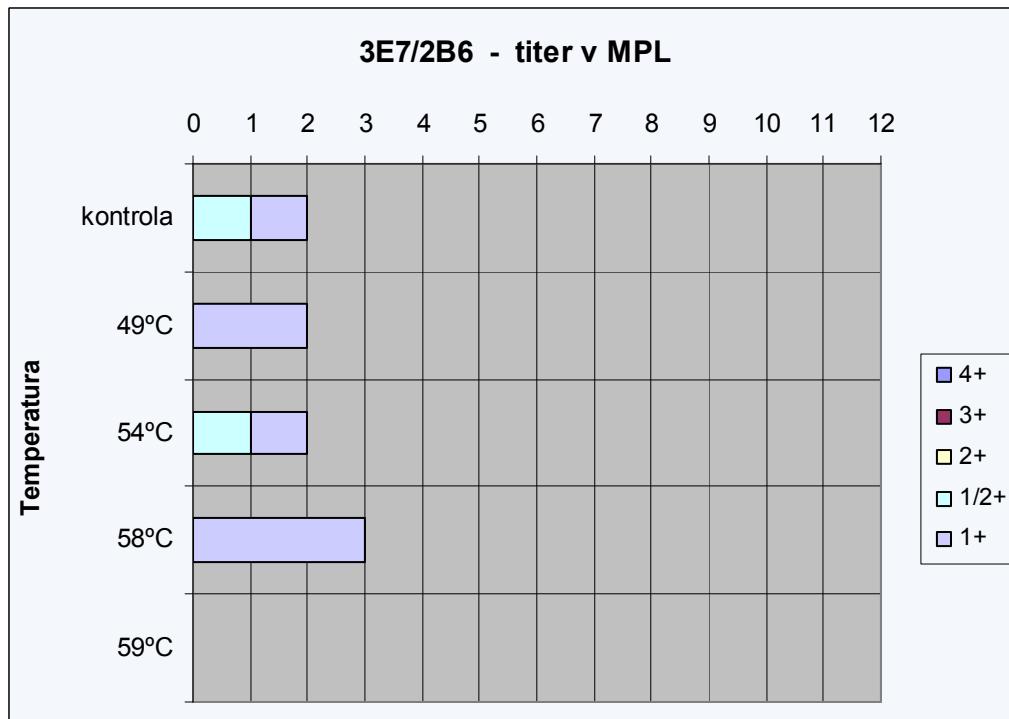
Pri višji temperaturi je dal boljši titer z Erci A1 kot pa z Erci A2B.

3E7/2B6 IgG

Graf 33: Padec titra z višanjem temperature, a-A, Erci A1.



Graf 34: Padec titra z višanjem temperature, a-A, Erci A2B.

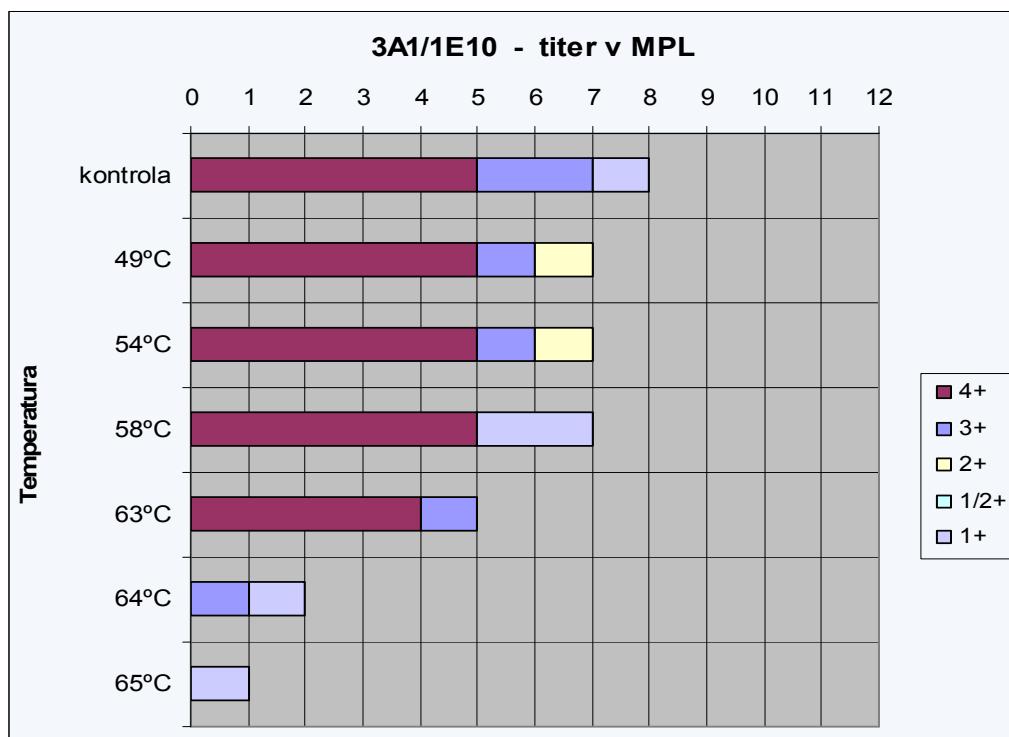


Pri višji temperaturi je dal boljši titer z Erci A1 kot pa z Erci A2B.

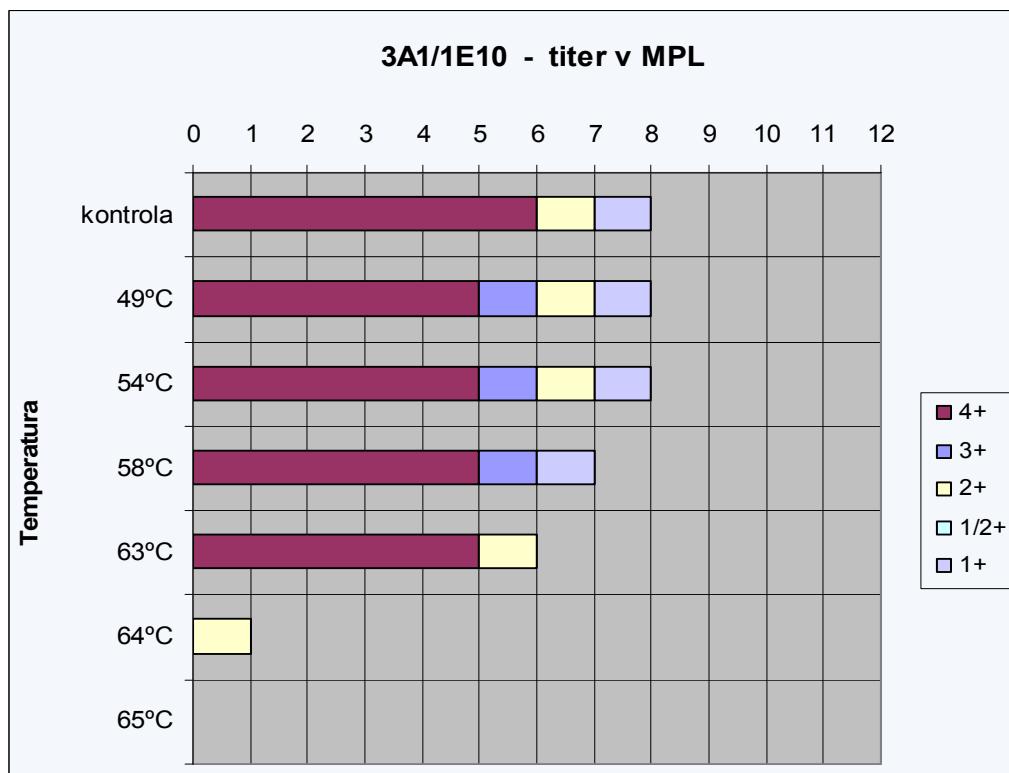
SN a-B

3A1/1E10 IgG

Graf 35: Padec titra z višanjem temperature, *a-B*, Erci *B*.

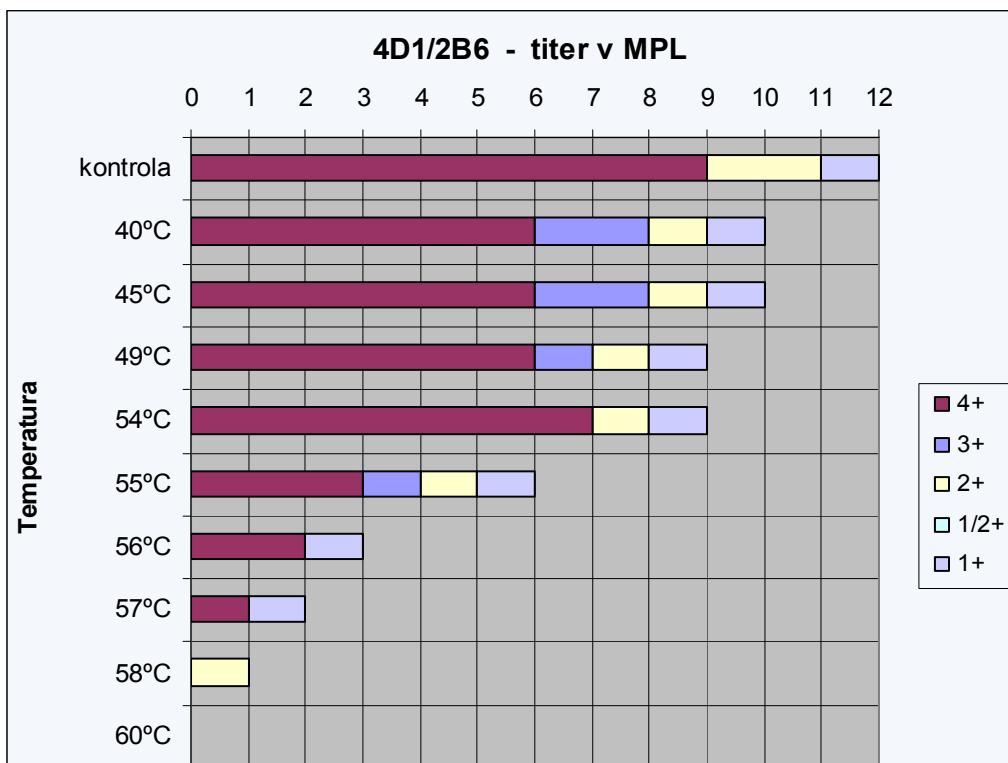


Graf 36: Padec titra z višanjem temperature, *a-B*, Erci *A2B*.

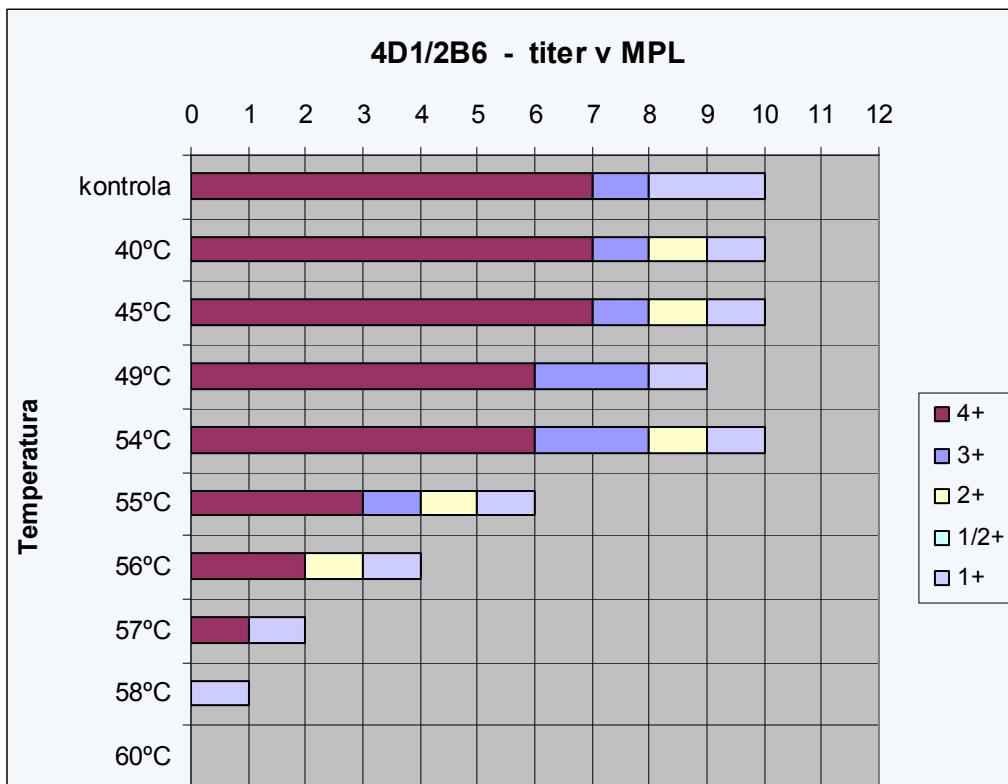


4D1/2B6 IgM

Graf 37: Padec titra z višanjem temperature, a-B, Erci B.



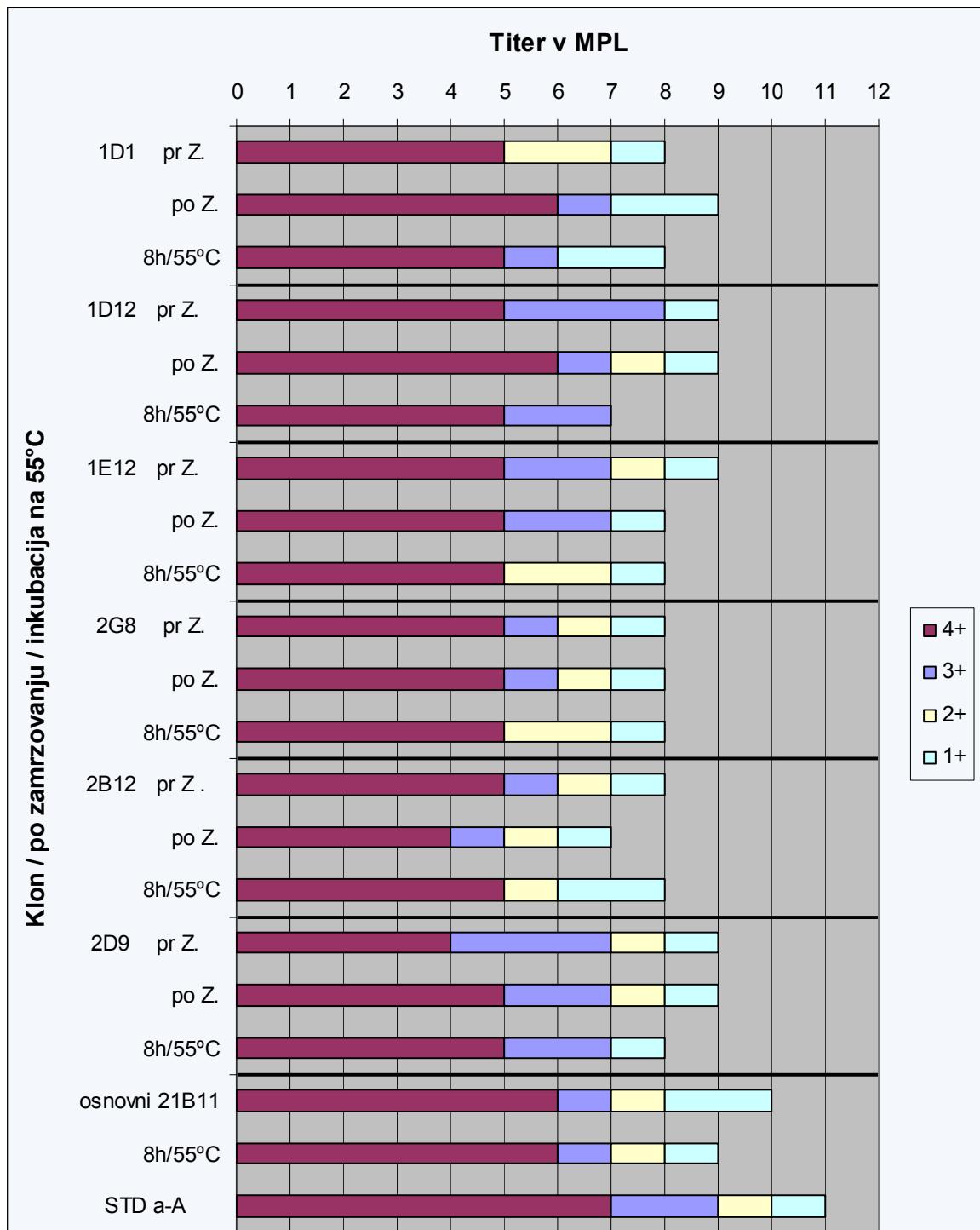
Graf 38: Padec titra z višanjem temperature, a-B, Erci A2B.



4.4. KLONI CELIČNE LINIJE Z mAbs 21B11

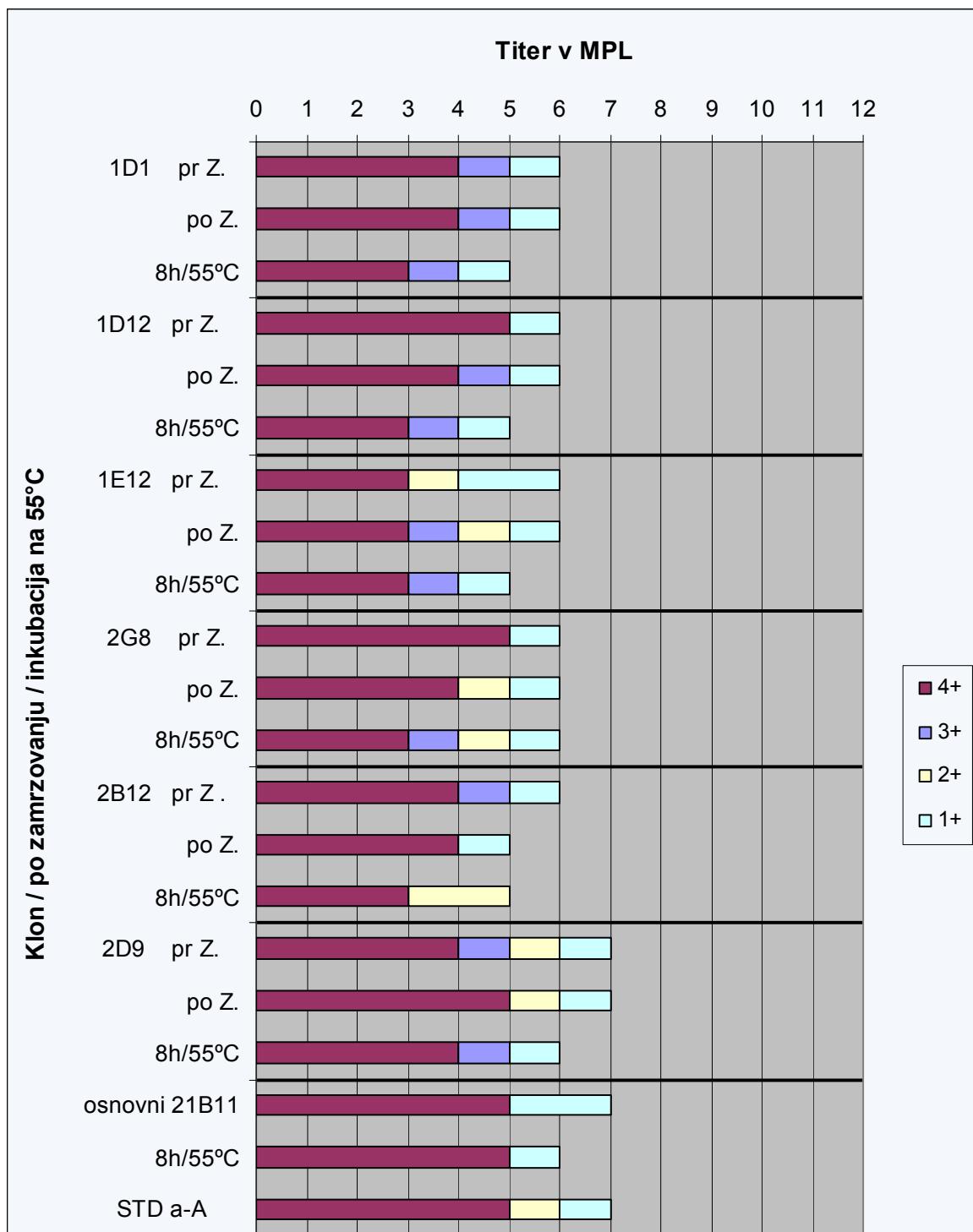
4.4.1. Titer

Graf 39: Titer mAbs v SN posameznih klonov, Erci A1: SN pred zamrzovanjem (pr Z), SN po zamrzovanju (po Z.), SN po 8-urnem staranju pri +55 °C (8h/55 °C).



Najboljši titer so imela mAbs osnovne linije 21B11. Vsi kloni pa so ohranili sposobnost aglutinacije Erci po zamrzovanju ter po 8-urnem segrevanju pri +55 °C.

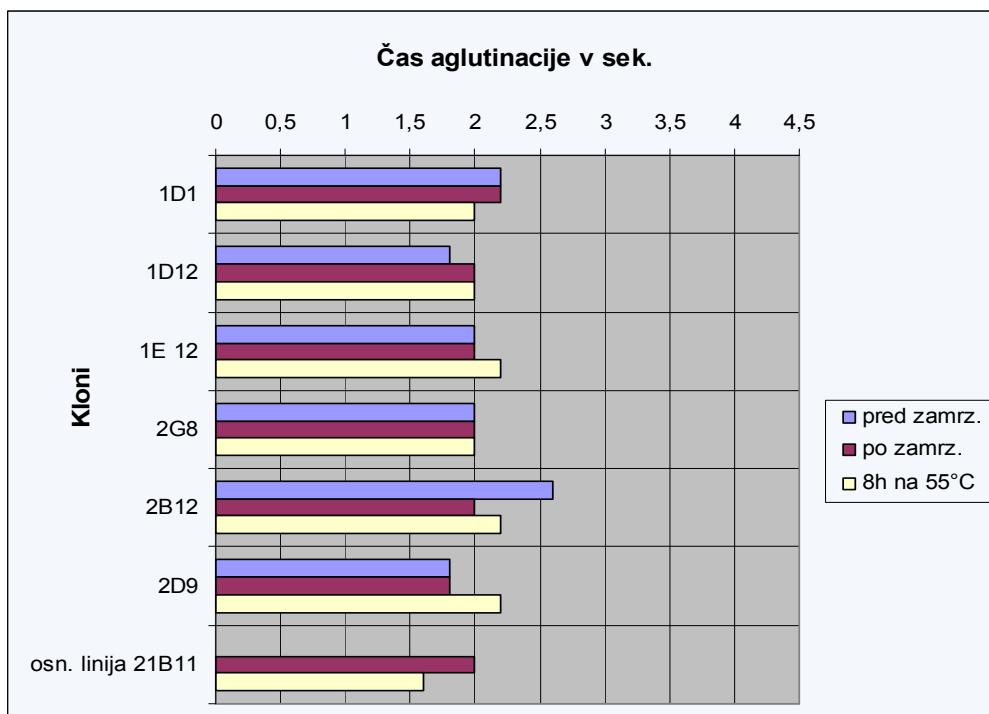
Graf 40: Titer mAbs v SN posameznih klonov, Erci A2B: SN pred zamrzovanjem (pr Z), SN po zamrzovanju (po Z.), SN po 8-urnem staranju pri +55 °C (8h/55 °C).



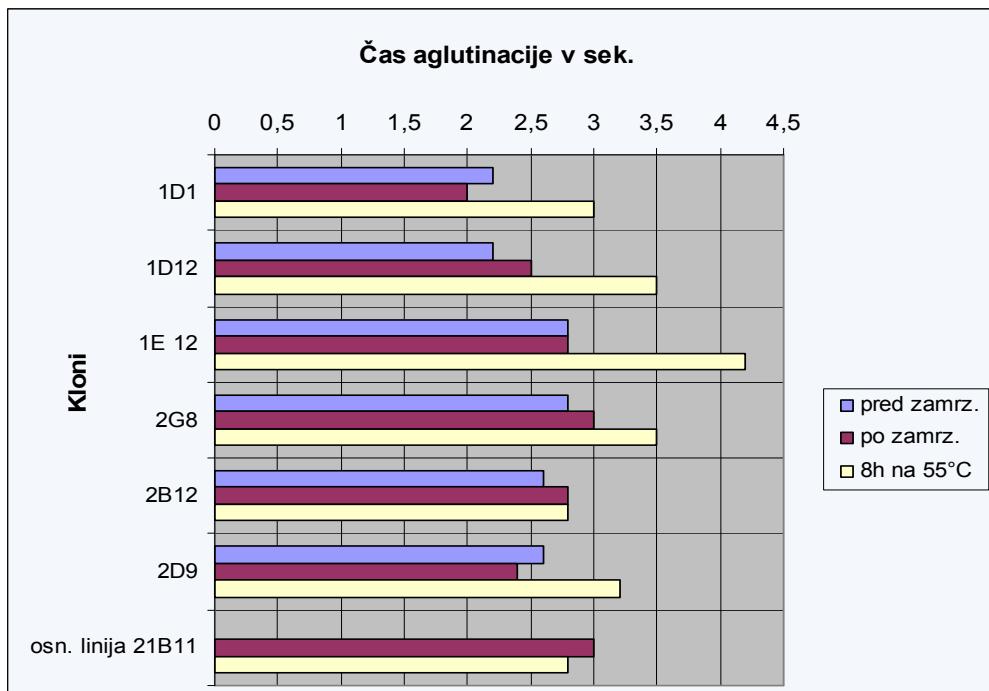
Kloni so ohranili tudi dokaj dobro sposobnost aglutinacije šibkih Erci.

4.4.2. Čas aglutinacije

Graf 41: Čas aglutinacije mAbs klonov pred zamrzovanjem (pred zamrz.), po zamrzovanju (po zamrz.) ter po staranju pri +55 °C (8h/55 °C), Erci A1.

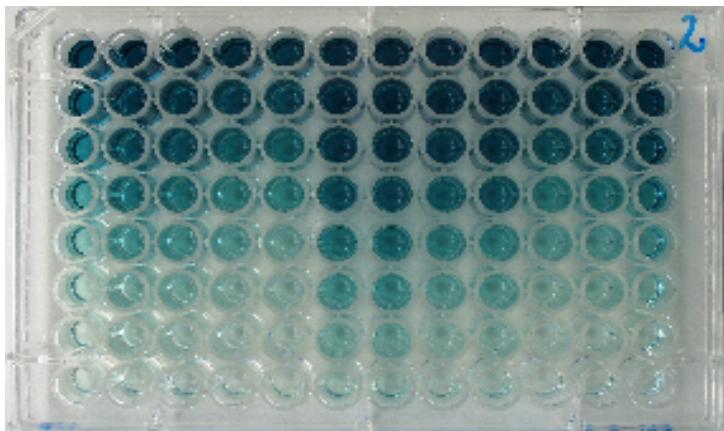


Graf 42: Čas aglutinacije mAbs klonov pred zamrzovanjem (pred zamrz.), po zamrzovanju (po zamrz.) ter po staranju pri +55 °C (8h/55 °C), Erci A2B.



Vsi kloni so imeli nekoliko podaljšan čas aglutinacije po 8-urnem staranju pri +55 °C.

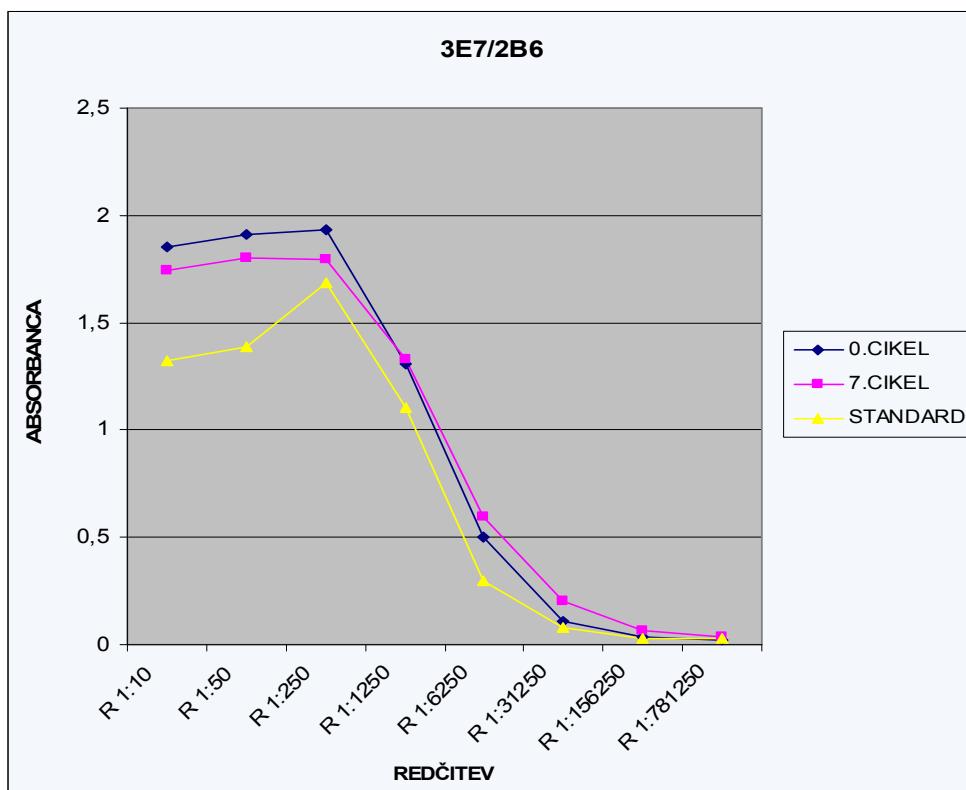
4.5. POSREDNI POSTOPEK ELISA



Slika 7: Na posebni MPL za ELISA-o smo določali afiniteto mAbs do Erci s pomočjo merjenja A zelenega produkta. Vzorec z ustrezno redčitvijo smo nanesli v kolono od zgoraj navzdol, tako da je v vdolbinici A1 najbolj koncentriran vzorec, v vdolbinici H1 pa najmanj.

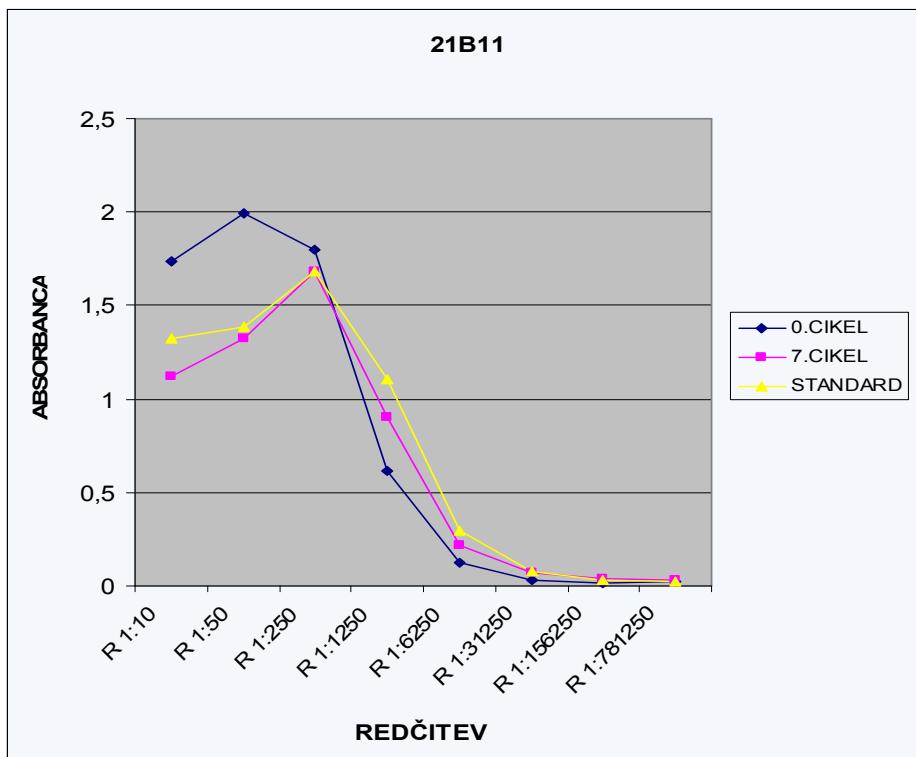
SN a-A

Graf 43: Relativna vsebnost mAbs 3E7/2B6 v redčitvah SN a-A.



mAbs 3E7/2B6 (tudi starani) imajo nekoliko višjo afiniteto do substance A kot standard ZTM a-A. Iz tega lahko sklepamo, da imajo mAbs tudi večjo afiniteto do Erci A.

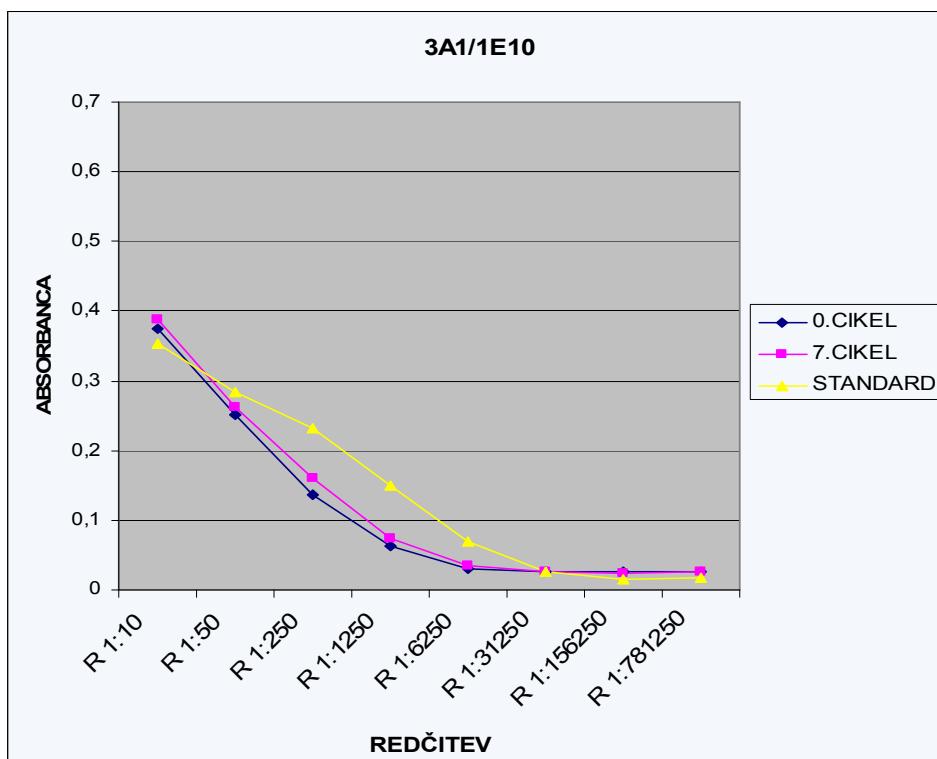
Graf 44: Relativna vsebnost mAbs 21B11 v redčitvah SN a-A.



Zanimivo je, da so imela ravno mAbs 21B11, ki so imela v vsem boljše rezultate kot ostali SN, manjšo afiniteto do Erci kot standard ZTM a-A (tako 0. kot 7. cikel).

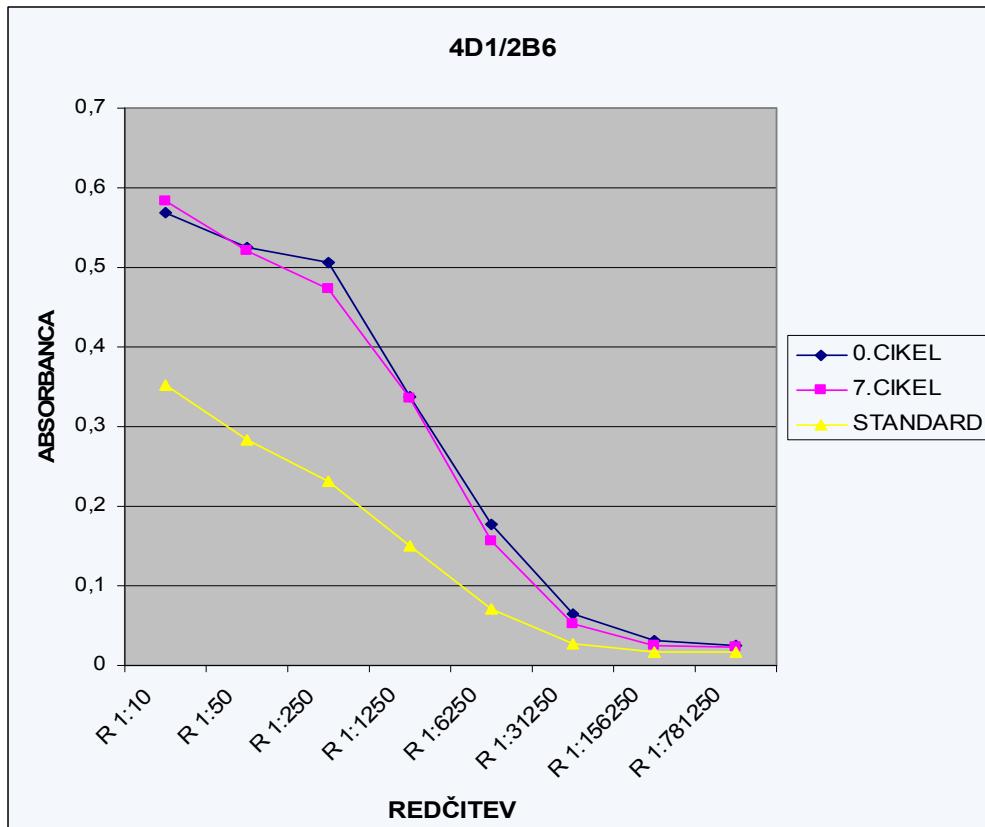
SN a-B

Graf 45: Relativna vsebnost mAbs 3A1/1E10 v redčitvah SN a-B.



Afiniteta do substance B in posledično do Erci B je pri nestaranem in pospešeno staranem SN nekoliko manjša kot pri standardu a-B ZTM.

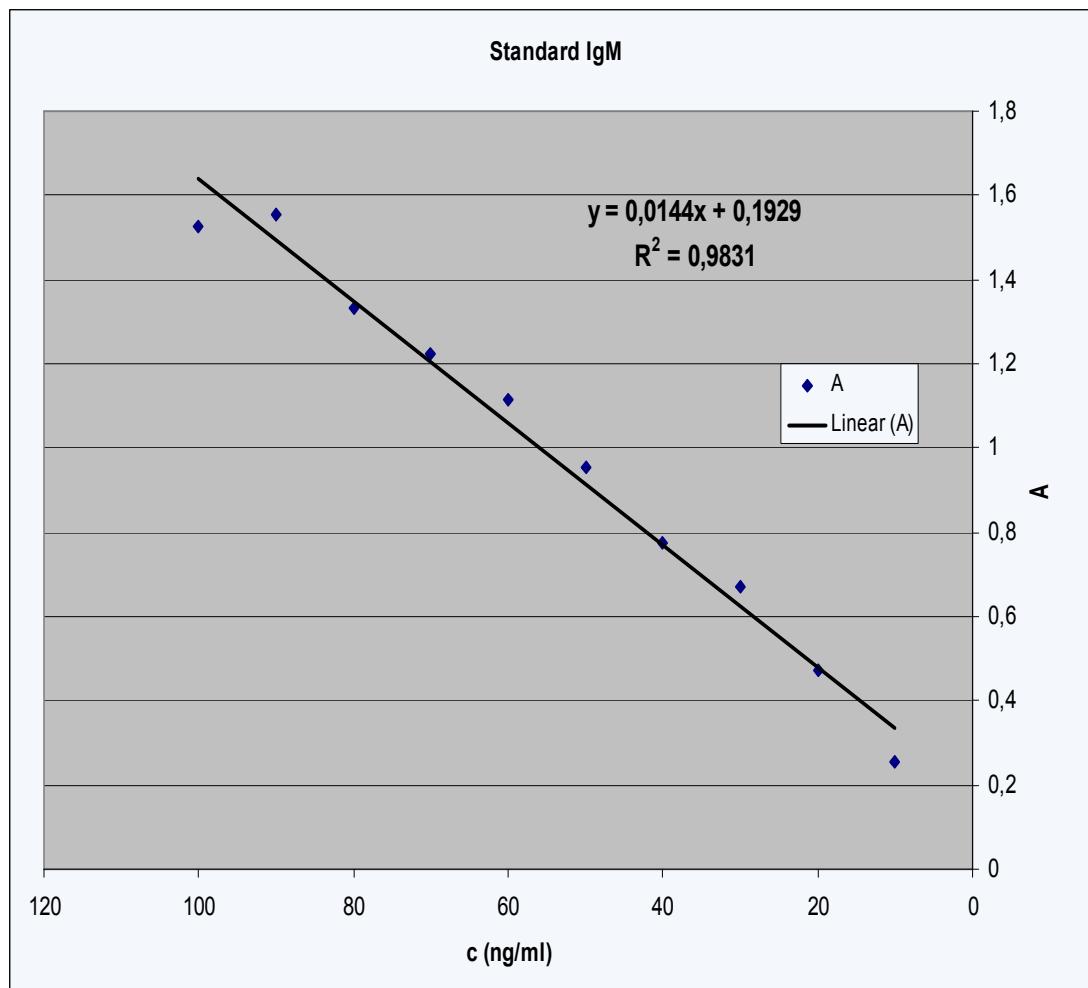
Graf 46: Relativna vsebnost mAbs 4D1/2B6 v redčitvah SN a-B.



mAbs 4D1/2B6 so pokazala bistveno večjo afiniteto do Ag kot standard a-B ZTM.

4.6. METODA »SENDVIČ ELISA«

Graf 47: Umeritvena krivulja za standard IgM.



Enačba 3:

$$y(A) = 0,0144x(c) + 0,1929 \\ R^2 = 0,9831$$

Izračunane koncentracije izbranih mAbs razreda IgM:

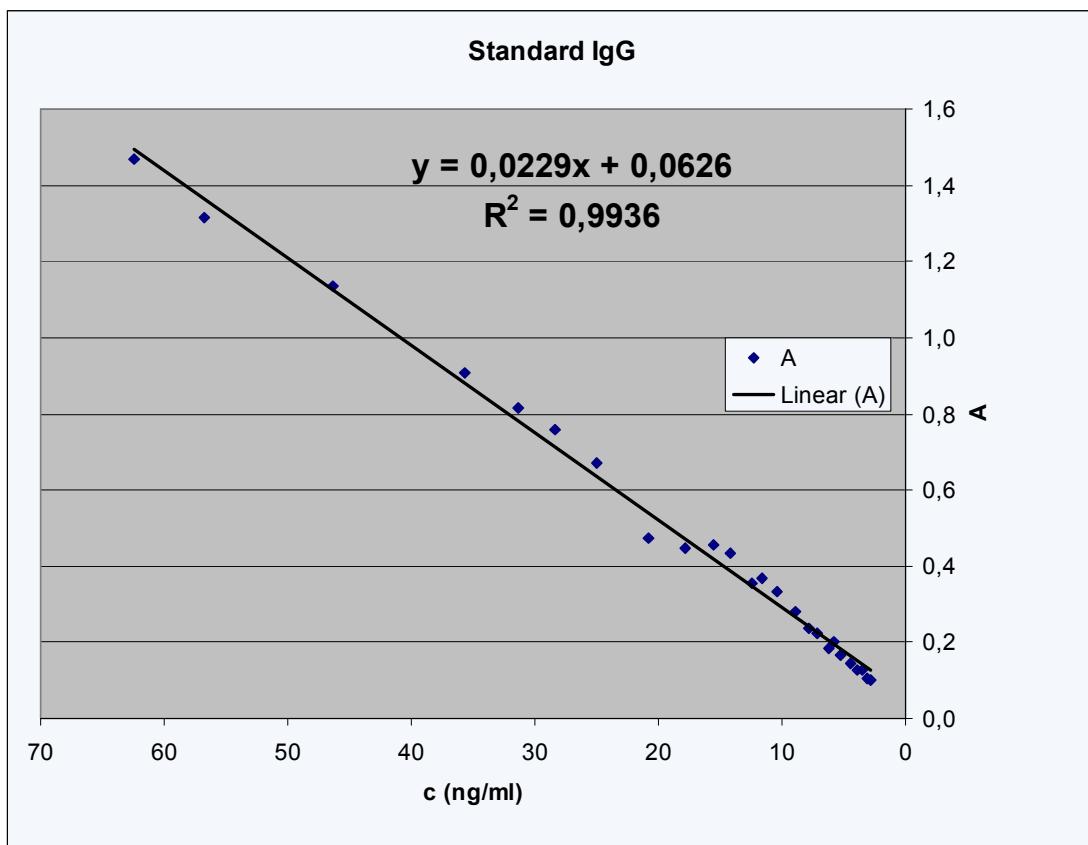
a-A

c (21B11)= 42,3 µg/ml

a-B

c (4D1/2B6)=164,25 µg/ml

Graf 48: Umeritvena krivulja za standard IgG.



Enačba 4:

$$y(A) = 0,0229x(c) + 0,0626$$

$$R^2 = 0,9936$$

Izračunane koncentracije izbranih mAbs razreda IgG:

a-A

c (3E7/2B6)= 79,15 µg/ml

a-B

c (3A1/1E10)= 552,62 µg/ml

5. RAZPRAVA

V preteklosti so za določanje krvnih skupin uporabljali reagente, ki so bili pripravljeni iz serumov prostovoljcev, pri katerih so našli primerna Abs. Ker je bila količina naravnih Abs pri večini premajhna, so prostovoljce dodatno imunizirali z ustrezeno substanco ali Erci. Tako so povečali koncentracijo Abs v plazmi, hkrati pa so tudi izboljšali lastnosti končnega reagenta. Takšni reagenti so bili poliklonski, saj Abs proizvajajo različni kloni limfocitov B. Taka Abs se med seboj razlikujejo, zato je bila standardizacija težka, poleg tega pa je obstajala tudi možnost okužbe.

Z razvojem medicine so se povečale potrebe po tovrstnih reagentih, količine človeških poliklonskih serumov pa so bile omejene. V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja sta Köhler in Milstein odkrila postopek priprave nesmrtnih celičnih linij hibridomov. Ti so proizvajali specifična mAbs in so imeli sposobnost rasti *in vitro*. To so potem s pridom uporabili tudi pri pridobivanju mAbs za določanje krvnih skupin.

Prisotnost Ag AB0 krvnoskupinskega sistema na Erci ugotavljamo na podlagi aglutinacije Erci z mAbs v ustreznem reagentu. Aglutinacijo lahko odčitamo ročno ali z avtomatskimi tehnikami. Ker napačna določitev krvne skupine pri transfuziji lahko vodi do zapletov, morajo imeti reagenti določene lastnosti, s katerimi opišemo njihovo učinkovitost. To so predvsem specifičnost, visoka afiniteta do Ag in termostabilnost. Te lastnosti se v času roka uporabnosti in z ustreznim shranjevanjem ne smejo spremeniti v takšnem obsegu, da bi to vplivalo na njihovo kakovost. To pa lahko zagotovimo le, če reagente ustrezeno testiramo in dobljene rezultate pravilno ovrednotimo.

Naša prva naloga po tem, ko smo uspešno nagojili celične linije in pripravili SN, je bila pospešeno staranje. S tem smo želeli ugotoviti, kakšna je stabilnost mAbs. S ponavljajočim izmeničnim zamrzovanjem vzorcev pri -20 °C za 24 ur in 24-urnim inkubiranjem pri +37 °C smo želeli napovedati, kakšna bo stabilnost mAbs v daljšem časovnem obdobju. Trije do štirje cikli pospešenega staranja, kot smo že omenili, ustrezajo enemu letu shranjevanja reagenta pri temperaturi od +2 do +8 °C (20). Število ciklov smo povečali na sedem, saj smo želeli ugotoviti, če bi bili reagenti lahko uporabni dve leti.

V literaturi je o metodah pospešenega staranja reagentov na osnovi mAbs in proučevanja stabilnosti na splošno napisanega zelo malo. Poleg zgoraj omenjenega smo zasledili le še

en protokol. Za študijo so si pripravili 7 alikvotov posameznega reagenta pri treh različnih temperaturah (+4 °C in +37 °C, ker sta to temperaturi, ki sta jih dejansko zanimali, in še vmesna temperatura +21 °C). Vzorce so tako jemali 3., 7., 10., 14., 17. in 21. dan, vzorec ob času 0 pa jim je služil za določitev začetne točke. Vsak reagent, ki je izkazoval več kot 80 % aktivnost po 14 dneh pri +37 °C, je ustrezal enemu letu roka uporabnosti, če so ga shranjevali pri temperaturi +4 °C. (23)

Titer SN a-A (vse SN smo do testiranja hranili v hladilniku pri +4 °C) na Erci A1 (graf 1) je po sedmih ciklih pospešenega staranja ostal približno enak ali pa se je rahlo povečal. To bi lahko razložili, če bi SN med inkubacijo pri +37 °C izhlapevali in se s tem koncentrirali. Vendar smo to skušali preprečiti tako, da smo centrifugirke zaprli s pokrovom in zatesnili še s parafilmom. Tudi zmanjšanja količine SN nismo opazili. Zato smo SN dodatno testirali in ugotovili, da smo dobili boljše titre, če smo SN po končnem segrevanju en dan hladili pri sobni temperaturi ali v hladilniku pri +4 °C. Enak rezultat pa smo dobili tudi, če smo SN hladili samo dve uri v hladilniku. Očitno mAbs potrebujejo določen čas, da se ohladijo, pri tem pa se zvijejo v prvotno obliko in tako postanejo spet aktivni.

Poleg tega pri ponavljačem zamrzovanju in taljenju lahko nastanejo agregati, po segrevanju pri +37 °C pa je pojav reverzibilen. Pospešeno staranje smo namreč zaključili s 24-urno inkubacijo pri tej temperaturi, nato pa smo SN shranili v hladilniku do testiranja. Mogoče bi dobili drugačne rezultate, če bi zaključili z zamrzovanjem. (16)

Pri testiranju z Erci A2B (graf 2), kjer je številčno Ag A na Erci zelo malo v primerjavi z Ag B, je bil titer precej slabši ali celo negativen že pri nestaranem reagentu. Z Erci A2 in A1B pa smo dobili zelo podobne rezultate kot pri testiranju z A1 in jih zato nismo posebej obravnavali.

Izmed vseh SN a-A je bila najboljša celična linija 21B11 (grafa 9 in 10), z mAbs razreda IgM, ki so zelo dobro aglutinirala tako močne (A1) kot šibke (A2B) Erci in to lastnost ohranila tudi po sedmem ciklu pospešenega staranja. Le z Erci A2B je bil titer po pospešenem staranju za eno redčitev nižji, vendar še vedno dovolj visok. Poleg 21B11 pa smo izbrali in podrobnejše predstavili še linijo 3E7/2B6 (grafa 11 in 12), mAbs razreda IgG, na katera pospešeno staranje prav tako ni imelo posebnega vpliva.

Tudi pri SN a-B so bili titri po sedmih ciklih približno enaki, ali pa so se rahlo izboljšali. Ni pa bilo bistvene razlike med titri mAbs pri Erci B (graf 3) in A2B (graf 4). To je

smiselno, saj pri krvni skupini A2B, kot že zgoraj omenjamo, številčno močno prevladajo Ag B nad Ag A2, in zato dajo rezultate zelo podobne tistim z Erci B.

Pri SN a-B nismo našli nobene tako izstopajoče linije kot pri a-A. Vendar smo izmed vseh izbrali eno linijo mAbs razreda IgM, in sicer 4D1/2B6 (grafa 13 in 14), pri katerih titri pri Erci B pri pospešenem staranju malenkost nihajo, končno pa so bili titri za eno redčitev višji kot pri 0. ciklu. Pri Erci A2B pa so bili titri precej podobni Erci B. Druga izbrana linija mAbs pa je bila 3A1/1E10, razreda IgG (grafa 15 in 16), pri katerih so bili rezultati titrov pri Erci B in A2B skoraj enaki in se po staranju niso znižali.

Poleg titra smo ugotavljali tudi avidnost mAbs, torej čas nastanka aglutinacije, ki je odvisen od tega, kakšno afiniteto imajo Abs do Ag. Pri tem naj bi bile opazne predvsem razlike med razredoma IgG (je monomer, zato manjši in naj bi potreboval več časa, da bi se povezal v aglutinat z Ag na površini Erci) in IgM (je pentamer).

Pri izbranih linijah 21B11 IgM (grafa 5 in 6) je bil čas aglutinacije pri Erci A1 in A2B enak in se tudi po pospešenem staranju ni spremenil. Pri mAbs 3E7/2B6 IgG (grafa 5 in 6) pa je bil čas nastanka vidne aglutinacije pri Erci A2B daljši kot pri A1. Po pospešenem staranju v 7. ciklu pa se je pri obojih Erci precej skrajšal.

Na splošno se čas aglutinacije po pospešenem staranju ni podaljšal. Hkrati tudi ni bilo vidne razlike v času aglutinacije med IgG in IgM. Vidna je bila le razlika med Erci A1 in A2B, kjer je bil čas nastanka aglutinata pri Erci A2B pri vseh SN, razen pri 21B11, daljši in se je pri nekaterih po pospešenem staranju za malenkost tudi podaljšal.

Za razliko od a-A pa je bila pri SN a-B (grafa 7 in 8) dobro vidna razlika v času aglutinacije med mAbs IgG in IgM. Pri IgG je čas aglutinacije znašal okrog 10 s, pri IgM pa 3 do 4 s. Na splošno se je čas aglutinacije po pospešenem staranju malo podaljšal oz. malo skrajšal, vendar ne bistveno. Ugotovili smo, da se je podaljšal predvsem pri mAbs IgG, skrajšal oz. ostal enak pa pri mAbs IgM. Rezultati pri Erci A2B pa so bili po pričakovanju podobni rezultatom pri Erci B. Pri izbranih vzorcih, torej mAbs 4D1/2B6 in 3A1/1E10, lahko rečemo, da se čas aglutinacije po staranju ni podaljšal in je ostal enak tako z Erci B kot A2B. Pri mAbs IgG pa je bil daljši kot pri IgM.

Izstopala pa sta dva klona mAbs razreda IgM, in sicer 5C12/1E9 in 5C12/1H8, ki sta imela čas aglutinacije nenavadno dolg že pri 0. ciklu, eden je imel celo daljšega od IgG, pri 7. ciklu pa se je malce skrajšal oz. ostal enak. Sicer pa sta tudi pri titru že vidno odstopala od vseh ostalih linij. Kot smo kasneje ugotovili s sendvič ELISA-o, imata SN kar visoko

koncentracijo mAbs, celo višjo kot ostali. Zato za slab rezultat ni odgovorna nizka koncentracija, ampak mogoče nizka afiniteta.

Titri in časi aglutinacij so pokazali, da se aktivnost mAbs a-A in a-B po sedmih ciklih pospešenega staranja ne spremeni bistveno.

Navadno namreč Abs s povisano temperaturo izgubljajo aktivnost, saj so proteini. V našem primeru pa so stabilni tudi pri daljšem izpostavljanju neugodnemu okolju.

Lahko rečemo, da so mAbs, ki jih proizvajajo celične linije, temperaturno stabilna in jih izmenjujoče zamrzovanje in segrevanje ne poškodujeta toliko, da bi to vplivalo na kakovost reagenta in s tem na njihovo zmanjšano uporabnost. Z ozirom na rezultate bi lahko zaključili, da so SN stabilni dve leti, če so shranjeni pri predpisani temperaturi od +2 do +8 °C.

Naša naslednja naloga pa je bila, da ugotovimo, kako vpliva na mAbs staranje pri +55 °C. Ta temperatura namreč predstavlja mejo za termostabilnost mAbs (20). Pri +55 °C naj bi se proteini denaturirali in s tem izgubili svojo sekundarno strukturo, torej zvitje (24), kar bi privedlo do večje občutljivosti mAbs in s tem do neaktivnosti.

Vse naše SN, tako 0. kot 7. cikel, smo izpostavili temperaturi +55 °C za 2, 4, 6, 8 ali 24 ur ter jim po končanem segrevanju spet določili titer in čas aglutinacije.

SN a-A smo po staranju pri +55 °C določali titer z Erci A1 (graf 17). Po 24-urnem segrevanju na splošno ni prišlo do bistvenih sprememb. Večji padec titra smo opazili le pri mAbs 5D1/1C2, tako pri 0. kot pri 7. ciklu. Pri mAbs 3E7/2B6 ni prišlo do sprememb, pri 21B11 pa je pri 0. ciklu po 24-urnem segrevanju titer celo narasel za eno redčenje. Kot smo ugotovili že pri pospešenem staranju, so tudi tu reagenti a-A slabo aglutinirali Erci A2B (graf 18). Kar nekaj je bilo negativnih ali pa zelo nizkih titrov, med njimi tudi 3E7/2B6, le 21B11 je imel še vedno dober titer tudi z Erci A2B.

Pri SN a-B pa smo opazili, da mAbs 4D1/2B6 niso termostabilna. Že po šestih urah segrevanja niso dala več pozitivne reakcije z Erci B (graf 19). Po dveh urah segrevanja pa je bil negativen tudi reagent a-B ZTM. Klonoma 5E4/2B1/1A9 in 5E4/2B6 je po 24-urnem segrevanju titer močno padel, slednjemu sicer manj, vendar sta še vedno aglutinirala Erci in smo ju smatrali za termostabilna. Ostalim SN pa segrevanje pri +55 °C ni poslabšalo titra. Podobne rezultate smo dobili tudi z Erci A2B (graf 20).

Pri ugotavljanju časa aglutinacije SN a-A z Erci A1 po segrevanju nismo opazili večjih sprememb, niti pri 21B11, niti pri 3E7/2B6, kar pomeni, da se afiniteta mAbs ni spremenila.

Pri SN a-B pa so mAbs 4D1/2B6 pri 0. in pri 7. ciklu z Erci B po segrevanju dala negativen rezultat. S tem smo potrdili, da niso termostabilna. Poleg tega smo opazili, da se je pri mAbs 5E4/2B1/1A9 in 5E4/2B6 po 24-urnem segrevanju pri +55 °C čas nastanka aglutinatov precej podaljšal. Glede na to, da se je pri obeh po segrevanju zmanjšal tudi titer, kar sem omenila že zgoraj, lahko sklepamo, da so tudi mAbs teh dveh linij občutljiva na povišano temperaturo. Prav tako so zanimiva mAbs 5C12/1H8 in 5C12/1E9, ki so imela že pri 0. ciklu precej daljši čas aglutinacije, kot ga imajo ostali IgM, po 24-urnem segrevanju pri +55 °C pa se je le-ta samo za malenkost skrajšal. S tem smo dokazali, da na njih povišana temperatura nima posebnega vpliva, ampak so sama mAbs drugačna kot pri ostalih IgM. Pri 3A1/1E10 in ostalih SN pa po segrevanju ni prišlo do bistvenih sprememb in lahko rečemo, da so termostabilni.

Glede mAbs, za katera smo ugotovili, da slabo prenašajo temperaturo oz. niso termostabilna, pa predlagamo možno rešitev, liofilizacijo. Kot smo omenili že v uvodu, bi jih morali shranjevati pod temperaturo +40 °C, ki predstavlja Tg za Abs, in zaščiteno pred vlago, ker bi s tem zmanjšali fizikalne spremembe.

Na splošno so SN a-A manj občutljivi na povišano temperaturo kot a-B. Izmed SN a-B pa so mAbs IgM občutljivejša kot IgG, kar je smiselno, saj so IgM večja kot IgG.

Ko smo ugotovili, katera mAbs so termostabilna in katera ne, smo se vprašali, pri kateri temperaturi se pričnejo spremembe in do katere temperature so sploh še aktivna. Ugotovili smo, da mAbs a-B, kljub temu da so v manjši meri termostabilna kot a-A, prenesejo nekoliko višjo temperaturo kot mAbs a-A. Vsi a-A so dali komaj še pozitivno reakcijo pri dve-urnem segrevanju pri temperaturi okrog +60 °C, npr.: 3E7/2B6 (grafa 33 in 34), razen mAbs 21B11 (grafa 31 in 32), ki so bila aktivna še pri +62 °C. Z Erci A2B je bil rezultat še nekoliko slabši, kar pa smo pričakovali. SN a-B, ki so bili termostabilni, so dobro prenesli še temperaturo okrog +63 °C, npr.: 3A1/1E10 (grafa 35 in 36), potem so prav tako postali negativni. 4D1/2B6 (grafa 37 in 38), za katerega smo dokazali, da ni termostabilen, je bil po dve-urnem segrevanju na +57 °C komaj še pozitiven, pri +60 °C pa že popolnoma negativen. Rezultati z Erci B so bili skoraj enaki rezultatom z Erci A2B.

Zaradi dobrih rezultatov mAbs 21B11 smo se odločili, da linijo kloniramo in s tem poskušamo pridobiti še boljše klone.

Po kloniranju smo celice nagojili in mAbs določili titer in čas aglutinacije ter rezultate vedno primerjali z osnovno linijo. Vsi kloni, tudi po zamrzovanju in po osem-urnem segrevanju pri +55 °C, so imeli z Erci A1 (graf 39) dober titer. Zato lahko rečemo, da so po zamrzovanju ohranili lastnost proizvodnje mAbs in termostabilnost. Prav tako so zadovoljivo aglutinirali šibke Erci A2B (graf 40), glede na to, da so ostali SN a-A dali komaj pozitivno reakcijo ali pa so bili celo negativni.

Bistvenih razlik v času aglutinacije med kloni, ki smo jih testirali pred in po zamrzovanju, nismo opazili niti z Erci A1, niti z A2B (grafa 41 in 42). Tudi po osem-urnem segrevanju pri +55 °C z Erci A1 ni bilo večjih razlik v času nastanka aglutinatov, se je pa le-ta po segrevanju podaljšal za 1 do 2 sekundi z Erci A2B, medtem ko se pri osnovni liniji ni bistveno spremenil.

Zaključimo lahko, da po kloniranju nismo uspeli pridobiti boljših linij kot je osnovna. So pa dobljeni rezultati med kloni zelo podobni, tako po titru kot po času aglutinacije, zato bi bilo možno, da so dobljeni kloni kloni iste celice. Tega ne moremo zagotovo trditi, saj bi za to morali ugotoviti, kakšno imajo aminokislinsko zaporedje na odločilnih mestih. Hkrati tudi ne moremo trditi, da je bila osnovna linija že monoklonska, čeprav smo dobili klone, ki so si med seboj zelo podobni. Pri pregledu ploščic, na katerih smo izvajali kloniranje, je bilo namreč pri nekaj vdolbinicah (2 ali 3) opaziti prisotnost dveh klonov.

Nazadnje smo s posrednim postopkom ELISA želeli ugotoviti afiniteto mAbs 0. cikla v primerjavi s pospešeno staranimi SN po 7. ciklu in v primerjavi s standardoma ZTM (ZTM a-A / ZTM a-B). Ugotovili smo, da so bili SN 7. cikla skoraj enaki nestaranim, pri nekaterih pa malenkost boljši. Torej jim pospešeno staranje ni škodilo. Večinoma so bili rezultati tudi primerljivi s standardom, nekajkrat pa so bili celo precej boljši. Zanimivo je, da se je 21B11 (graf 44), kljub temu da je vedno izkazoval zelo dobre lastnosti, tu izkazal za slabšega, 3E7/2B6 (graf 43) pa za boljšega od standarda. Pri SN a-B je imel daleč najboljše rezultate 4D1/2B6 (graf 46), ki so bili kar precej nad standardom. Ostali, tudi 3A1/1E10 (graf 45), so bili večinoma malo slabši, nekateri pa so se zelo približali standardu. Noben SN pa se ni izkazal za resnično slabega.

Ker nas je zanimala tudi koncentracija mAbs v osnovnih SN (0. cikel), smo s postopkom sendvič ELISA določili umeritveno krivuljo in enačbo premice za standard IgM (graf 47) in IgG (graf 48), iz katerih smo zatem izračunali koncentracije naših mAbs.

Pri IgG smo v povprečju izračunali precej višje koncentracije kot pri IgM. Pri IgM so bile vse koncentracije nižje od 170 µg/ml, pri IgG pa smo izračunali tudi koncentracijo, ki je bila večja od 500 µg/ml.

Hkrati smo tudi ugotovili, da imajo SN a-B (IgG in IgM) precej višje koncentracije kot a-A. Zato so mogoče po segrevanju pri +55 °C dali boljše rezultate kot a-A.

Po rezultatih sodeč koncentracija mAbs v SN pred pospešenim staranjem na splošno nima odločilnega pomena za dober rezultat. Kot smo izračunali, ima npr.: 21B11 dvakrat nižjo koncentracijo kot 5D1/1C2 (99,21 µg/ml). Kljub temu pa da precej boljši rezultat z Erci A2B, slednji je na A2B celo negativen. Enako smo opazili tudi pri linijah 5C12/1E9 in 5C12/1H8, ki imata od vseh a-B IgM najvišjo koncentracijo, vendar pa sta imela najdaljši čas aglutinacije.

6. SKLEP

- Z ozirom na titre in čase aglutinacije pri pospešenem staranju lahko trdimo, da so testirani SN stabilni in primerni za uporabo, če jih hranimo pri temperaturi od +2 do +8 °C, dve leti.
- Na podlagi titrov in časov aglutinacije po staranju SN pri +55 °C lahko zaključimo, da so SN, razen a-B 4D1/2B6 in ZTM, termostabilni in tako prenesejo vsaj 24-urno segrevanje pri tej temperaturi.
- Ugotovili smo, da SN a-B, kljub dvema linijama, ki ne proizvajata termostabilnih mAbs, v povprečju prenesejo 3 °C višjo temperaturo kot a-A; a-B +63 °C in a-A +60 °C.
- Pri kloniranju linije a-B z mAbs 21B11 smo sicer dobili klone, ki so dali dobre titre in čase aglutinacij pri testiranju tudi z Erci A2B, po zamrzovanju so ohranili sposobnost proizvodnje mAbs in termostabilnost, vendar pa noben klon ni bil boljši od osnovne linije.
- S posrednim postopkom ELISA smo primerjali relativne vsebnosti mAbs SN 0. in 7. cikla s standardom ZTM. Iz tega smo sklepali na afinitete mAbs do Ag ter ugotovili, da večinoma niso bistveno odstopale od standarda, le nekatere so bile boljše. Pa tudi mAbs po 7. ciklu v večini niso bila slabša od 0. cikla. S sendvič ELISA-o pa smo ugotovili, da imajo na splošno SN z mAbs razreda IgG precej višjo koncentracijo kot IgM. Hkrati pa je tudi koncentracija SN a-B večja kot pri SN a-A.

7. LITERATURA

1. Yamamoto F., 2004. AB0 bloodgroup system – ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A in B glycosyltransferases and AB0 genes, Review. *Immunohematology*, 20, 1:3-22.
2. Alscher M., 1995. Priprava monoklonskih protiteles ter reagentov, primernih za določanje antigenov krvnoskupinskega sistema AB0. *Magistrsko delo*. Ljubljana.
3. Lapierre Y., Rigal D., Adam J., Josef D., Meyer F., Greber S. and Drot C., 1990. The gel test: a new way to detected cell antigen – antibody reactions. *Transfusion*; 30: 109 – 113.
4. http://www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk4119/molekularna_imunologija_-navodila_za_vajo_1.pdf (22.08.2009)
5. Watkins W. M., 1980. Advances in human genetics, Plenum, New York, Chapter 1.
6. Clausen H., Levery S. B., Dabelsteen E., Hakomori S., 1987. Blood group ABH antigens: A new series of blood group A-associated structures (Genetic regulation and tissue distribution), *Transplantation Proceedings*, 19, 6: 4408-4412.
7. Clausen H., Hakomori S., 1989. ABH and related histo-blood group antigens, *Vox Sang.* 56, 1-20.
8. Rožman P., 1995. Določanje krvne skupine sistema AB0. *Transfuzijski tečaj*, Ljubljana.
9. Vozelj M., 2000. Temelji imunologije, DZS d.d. Ljubljana.
10. <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/lifescience/generalbiology/Physiology/LymphaticSystem/Antibodymediated/Antibodymediated.htm> (31.08.2009)
11. <http://sanidadanimal.info/cursos/inmun/cuarto3.htm> (31.08.2009)

12. Smrekar B., 2005. Priprava nove generacije monoklonskih protiteles proti eritrocitnim antigenom. *Diplomsko delo*. Ljubljana
13. http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Stabilnost_zdravil/definicije_STAB.pdf (27.08.2009)
14. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html> (27.08.2009)
15. Štrukelj B., Kos J., 2007. Biološka zdravila: od gena do učinkovine, SFD Ljubljana.
16. Wang W., Singh S., Zeng D. L., King K., Nema S., 2007. Antibody structure, instability, and formulation, Minireview. *J. of Pharm. Sci.*, 96, 1:1-26.
17. Kristl J., Zajc N., Gašperlin M., 2001. Inhalacijski aerosoli za lokalno in sistemsko dostavo učinkovin, Članek. *Medicinski razgledi*; 40: 401-414
18. Čurin-Šerbec V., 1997. Reagenti za določanje krvnih skupin, *Podiplomska šola za zdravnike*, Kranjska Gora.
19. McGowan A., Tod A., Chiriside A., Green C., McCole K., Moore S., Yap P. L., McClelland D. B. L., McCann M. C., Micklem L. R., James K., 1989. Stability of murine monoclonal anti-A, anti-B and anti-A,B AB0 grouping reagents and a multi-centre evaluation of their performance in routine use, *Vox Sang.* 56, 122-130.
20. Diamed, Švica; ustni vir
21. Walker R. H. in sod., 1993. AABB – American Association of Blood Banks. *Technical manual*, 11th edition, Bethesda, Maryland.
22. Strajnar V., 1992. Priprava polimerov govejega serumskega albumina za ojačanje aglutinacijske reakcije. *Magistrsko delo*, Ljubljana.
23. Gosling J. P., 2000. Immunoassays, a practical approach. *Oxford University press*.

24. Jaenicke R., Heber U., Franks F., Chapman D., Griffin Mary C. A., Hvidt A., Cowan D. A., 1990. Protein structure and function at low temperatures. *Philos. Trans. R. Soc. Lon. B, Biol. Sci.*, 326, 1237: 535-553.