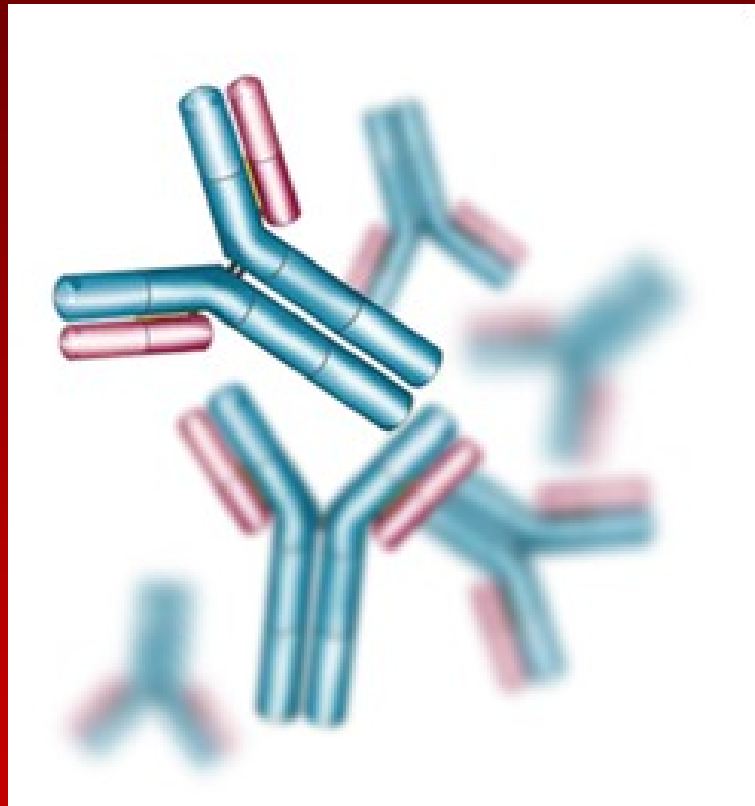


# PRAKTIKUM č.2



ÚKIA, LF MU, Mgr. Olga TICHÁ

# PROTILÁTKY

- protilátky jako základní reagens při imunologických metodách
- základní charakteristika reakce Ag – Ab

# Obečné princípy reakce Ag - Ab

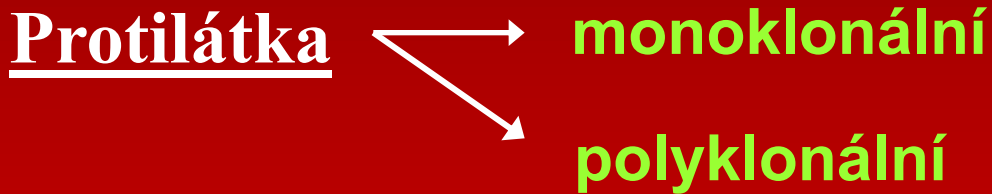
---

**Antigen** – látka schopná vyvolat imunitní reakci



vazebné místo: EPITOP (antigenní determinanta)

---

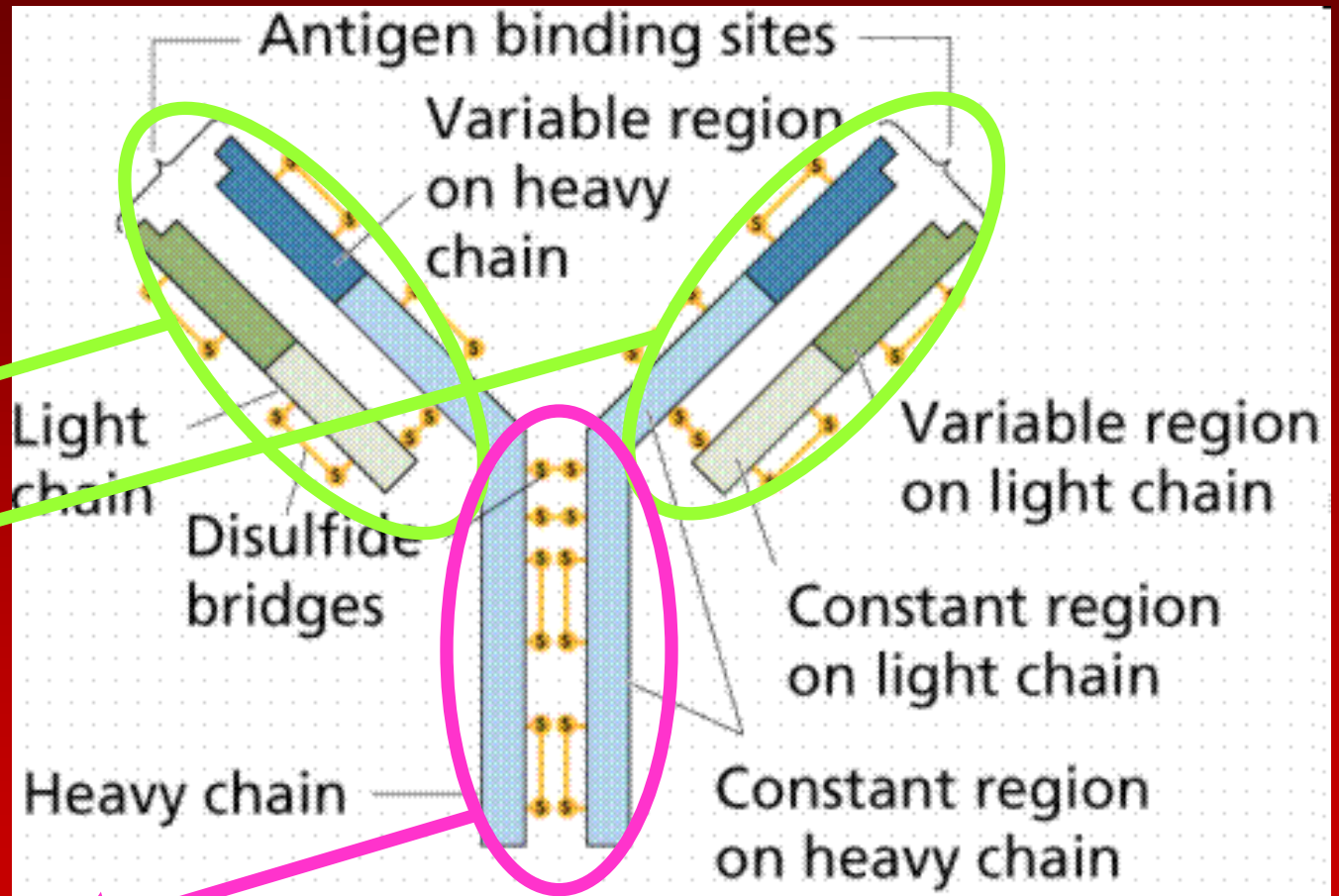


vazebné místo: PARATOP

---

**AFINITA** (epitop s paratopem) a **AVIDITA**

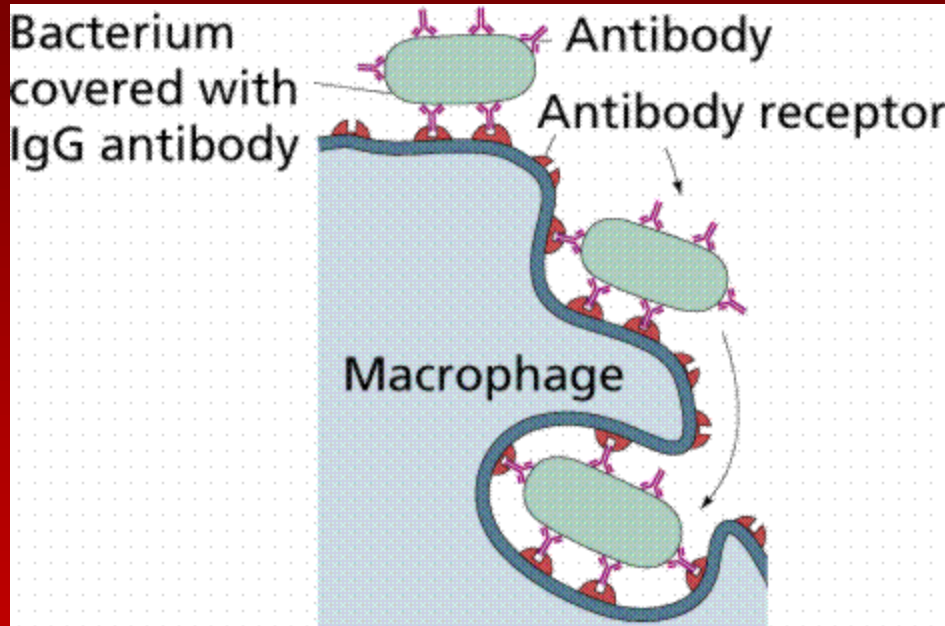
# PROTILÁTKY (Ab)



Fab

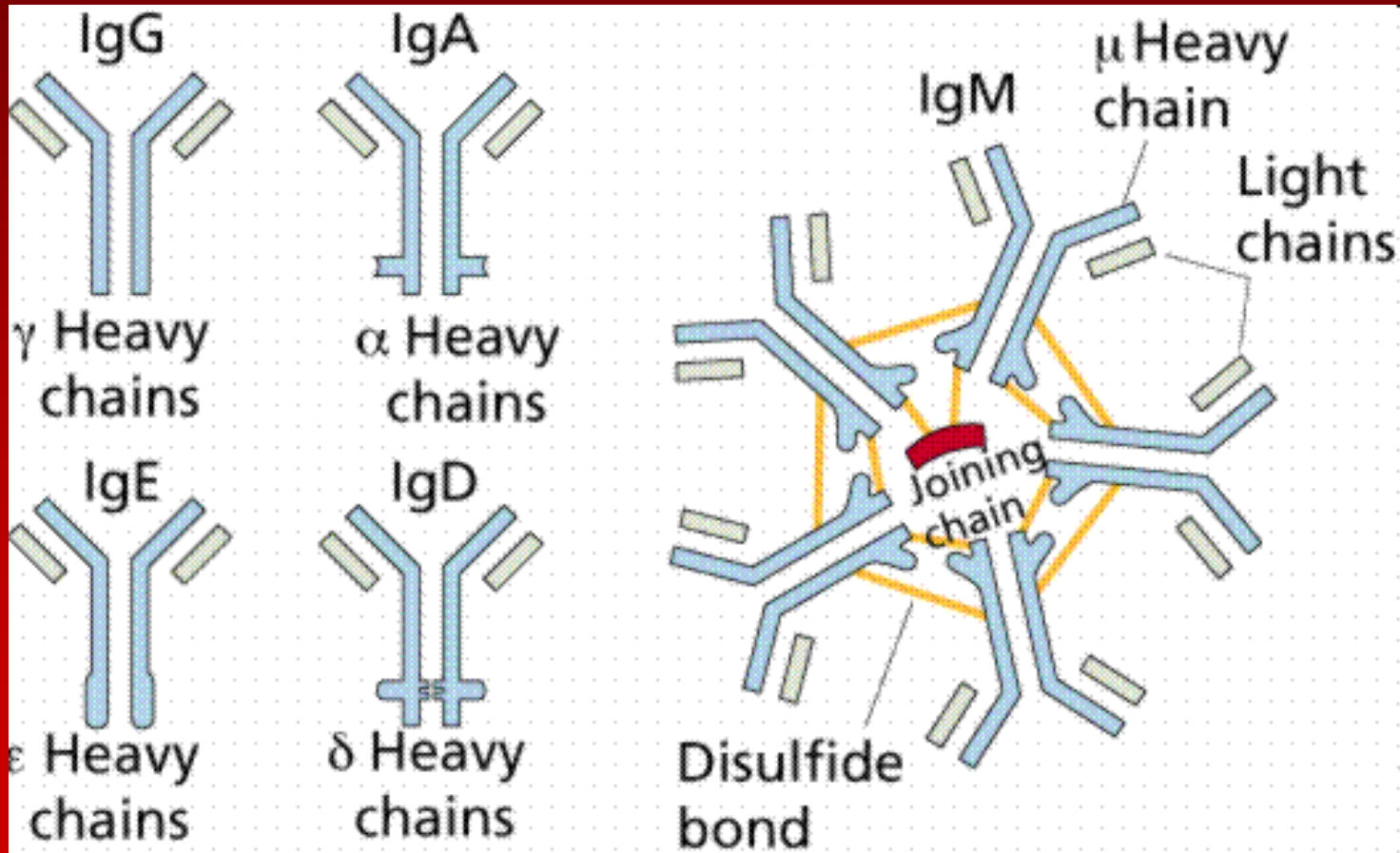
Fc

# Rozeznání Fc Ab makrofágem

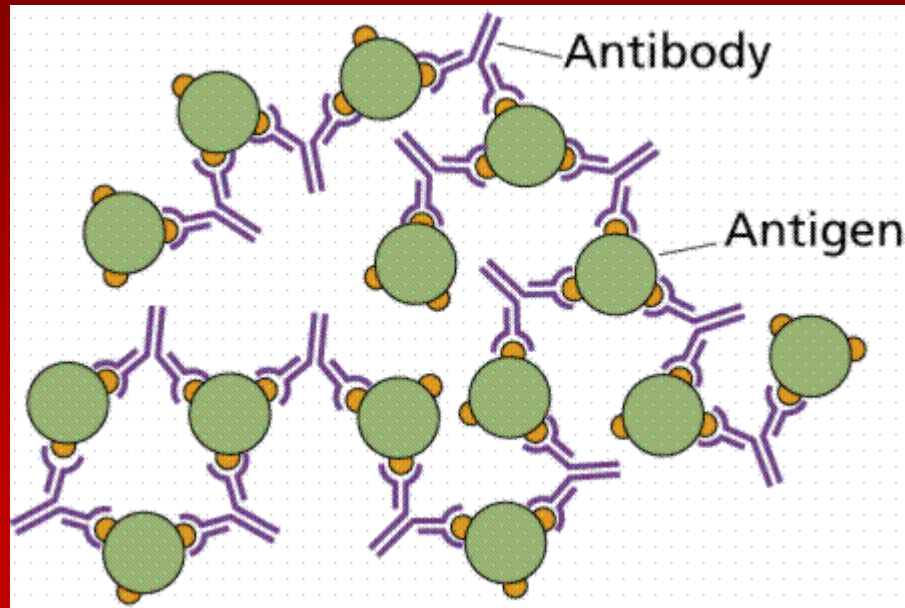


# TŘÍDA PROTIŁÁTEK

- dle typu konstantního řetězce



# Interakce volného Ag s volnými Ab



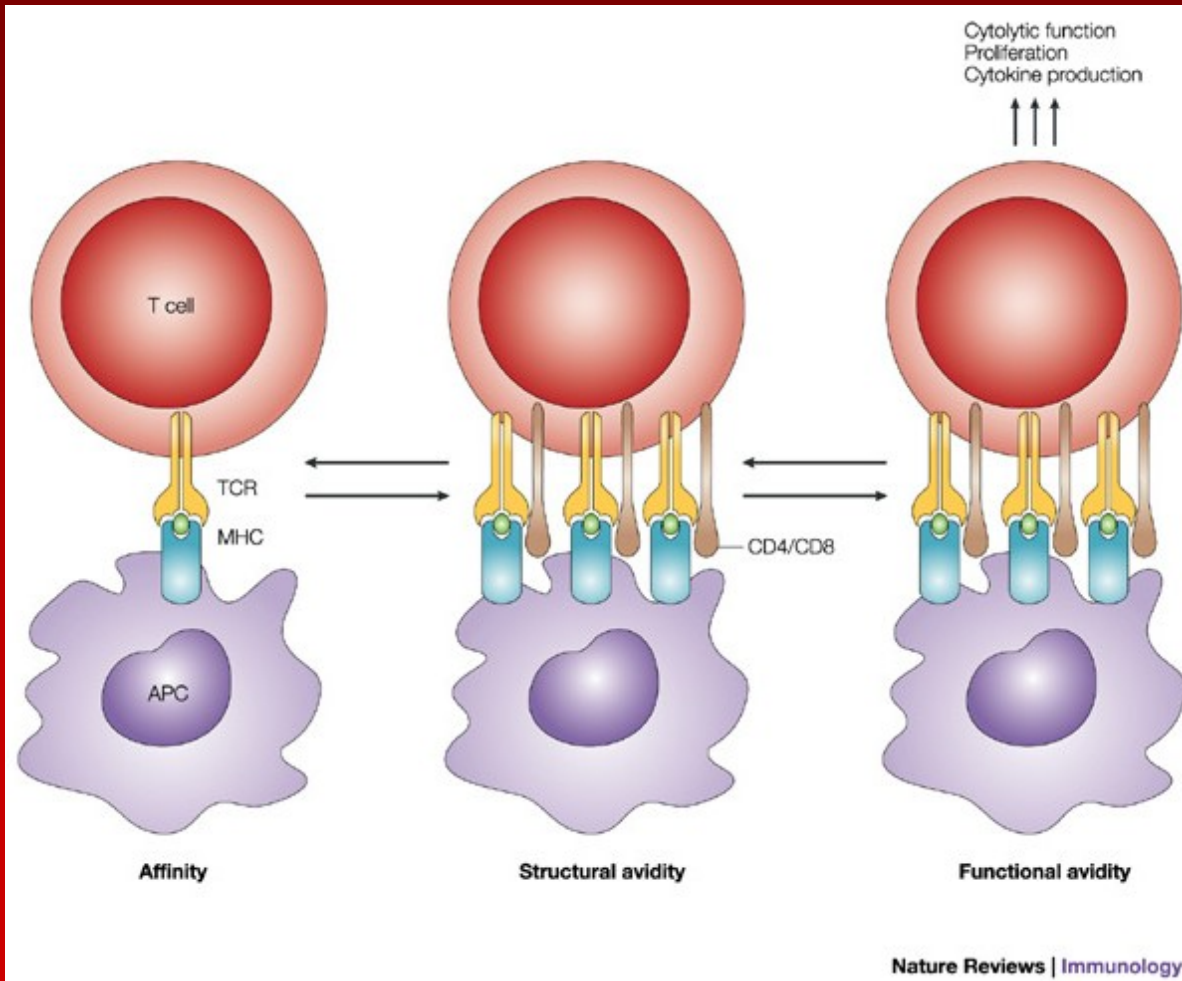
# AFINITA

- vazba Ag-Ab zahrnuje vodíkové můstky, iontové vazby, hydrofóbní interakce, van der Waalsovy síly
- dána velikostí síly mezi jedním vazebným místem Ab a jedním epitopem Ag



# AVIDITA

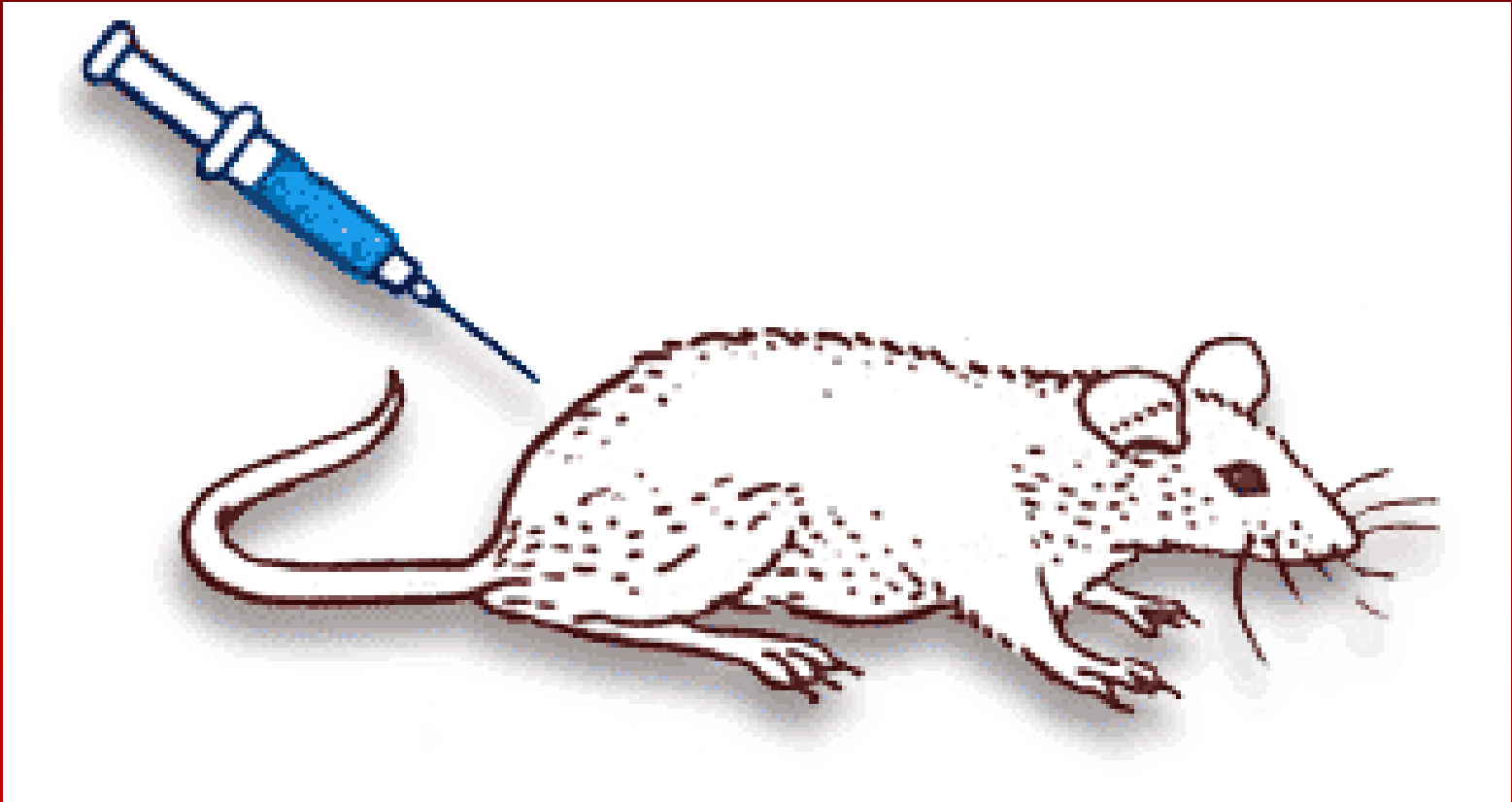
- dána vícenásobnou interakcí mezi multivalentní Ab a Ag (opakovaný epitop na povrchu)



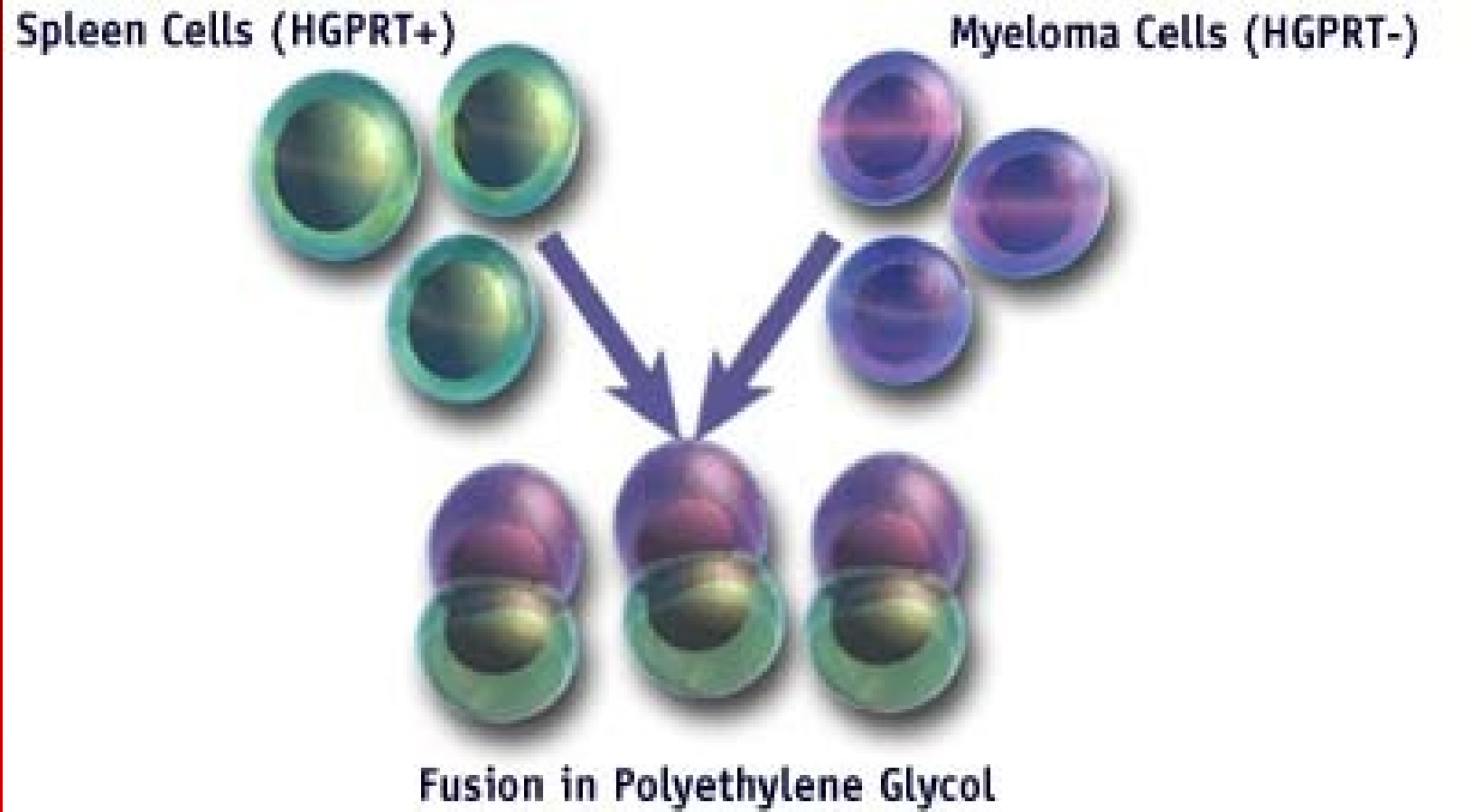
**POZOR!**

**Antigenem může být i  
protilátka!!!**

# PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK I.

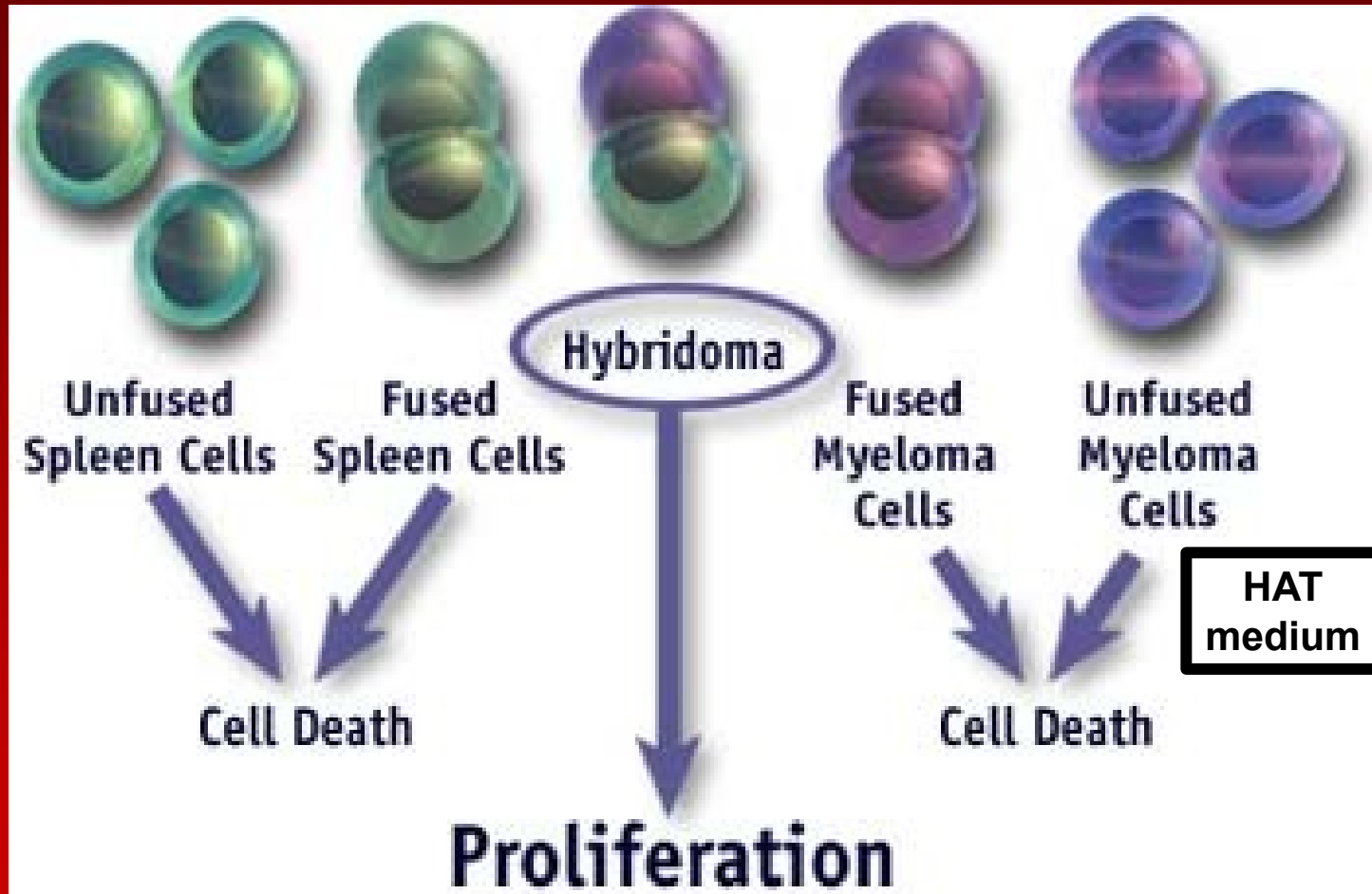


# MAb II.



HGPRT = hypoxantin-guanin fosforibožyl transferáza

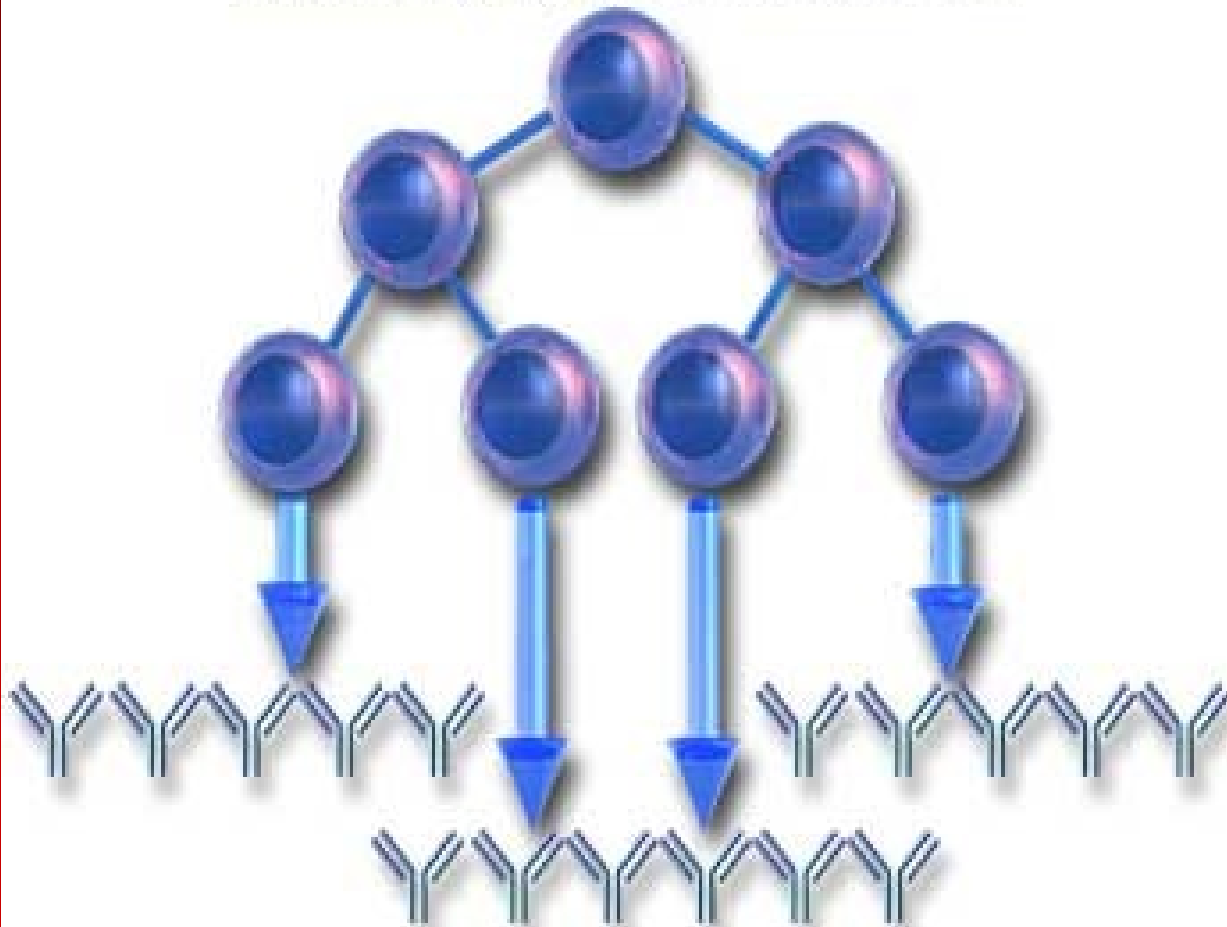
# MAb III.



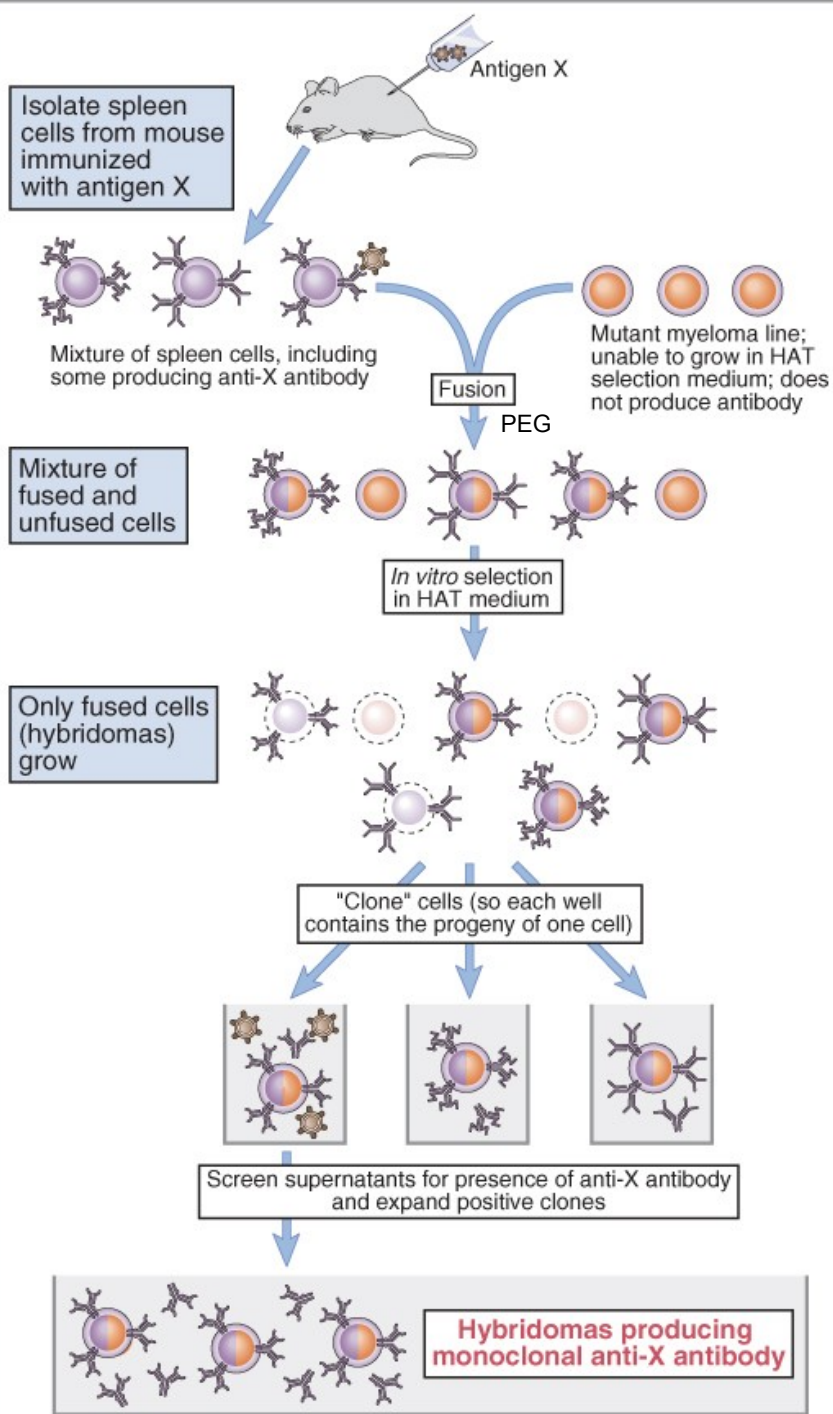
HAT obsahuje Hypoxantin, Aminopterin, Tymin

# MAb IV.

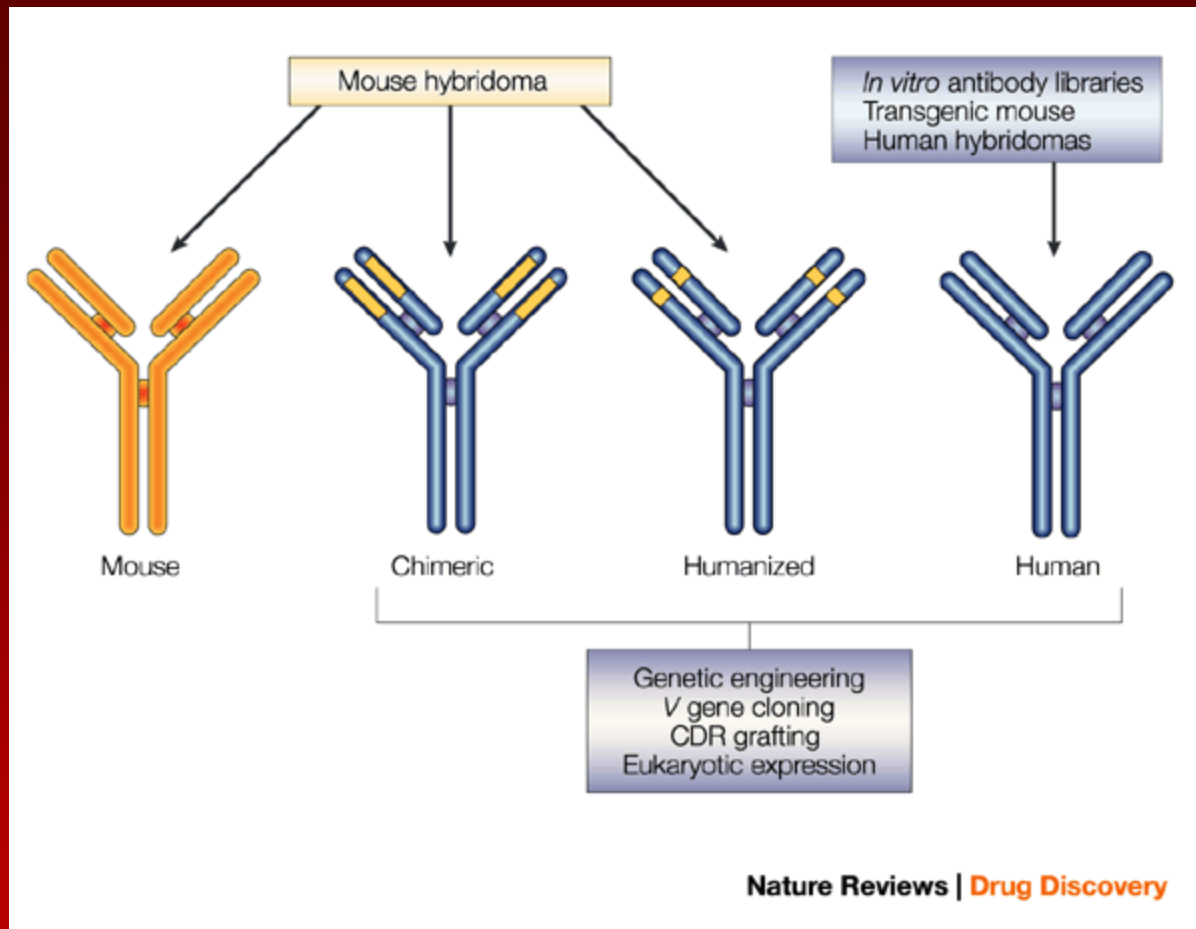
Clonal expansion of a single cell



Monoclonal antibodies with single antigen specificity



# MAb POUŽÍVANÉ K TERAPII



- **Myší (celé) -momab**
- **Chimérické (myší  $V_H V_L$ ) -ximab**
- **Humanizované (myší hypervar.úseky) -zumab**
- **Lidské (připravené technikami mol.biol. dle knihoven)**



# Příklady klinického využití monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických chorob

- **Imunosuprese:**
  - - anti-CD3 (OKT3),
    - anti CD25 (basiliximab, daclizumab),
    - anti CD20 (rituximab)
- **Blokáda prozánětlivých cytokinů:**
  - Anti –TNF-a (infiximab, adalimumab) – revmatoidní artritida, Crohnova choroba,
- **Blokáda adhezivních molekul:**
  - anti integrin  $\alpha 4\beta 1$  (natalizumab) – roztroušená mozkomíšní skleróza
  - Anti-CD11a (efalizumab) - psoriáza
- **Protialergická léčba**
  - anti-IgE (omalizumab): těžké formy astmatu

# Monoklonální protilátky v humánní medicíně

- Transplantologie

Muronomab-CD3 , Basiliximab (IL2r alfa, chim.),  
Daclizumab (IL2r alfa, hum.)

- Kardiologie

Abciximab (glykoprotein IIb a IIIa trombocytů, chim.)

- Revmatologie

Infliximab (TNFalfa, chim.) Adalimumab (TNFalfa, lidská)

- Gastroenterologie

Infliximab (TNFalfa, chim.)

- Infekční lékařství

Palivizumab (F-protein RSV, hum.)

- Neurologie

Natalizumab (inhibitor adhesivní molekuly a4 b1) - SM

# Monoklonální protilátky v humánní medicíně

- **Onkologie**

Trastuzumab (HER2 onkoprotein, hum.), *ca mammae*

Cetuximab (epithelial growth factor receptor EGFR1,

chim.), Edrecolomab (epithelial cell adhesion molecule,

myší) *kolorektální ca*

- **Hematoonkologie**

Rituximab (CD20 na B-lymfocytech, chim.) *nehodgkinský lymfom, CLL*

Alemtuzumab (CD52 na B,T,NK,mono, hum.) *CLL*

- **Alergologie**

Omalizumab (humanisovaná anti IgE)

# Produkce antigenů a protilátek v transgenních rostlinách

- **Rekombinantní protilátky**

SIgA/G Streptococcus mutans (tabák)

IgG HSV2glykoprotein B ( sója)

scFv-bryodin 1 imunotoxin CD40

(tabák,bun.susp.)

- **Rekombinantní podjednotkové vakcíny**

HBsAg (tabák)

Glykoprotein viru vztekliny (rajče)

Termolabilní enterotoxin E.coli (tabák, brambory)

Virus prasečí gastroenteritidy (tabák, kukuřice)

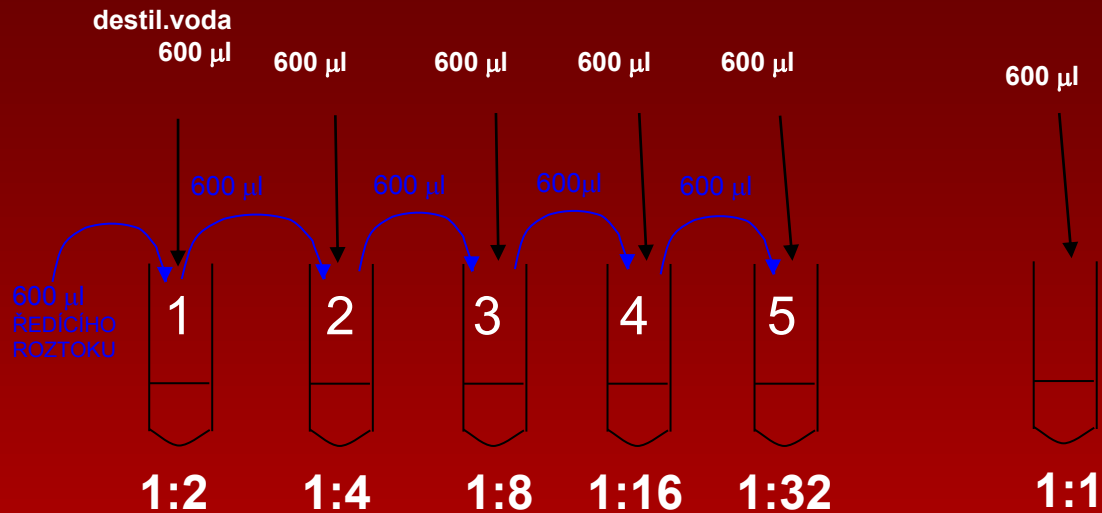
*(Ma KCJ et al.: Nature Rev Genetics 2003; 4: 794-805)*

# CVIČENÍ Č.1

- Úkol č.1: ředění geometrickou řadou  
(sloupce 1,2)
- Úkol č.2: pipetování do mikrotitrační destičky  
(sloupce 3-11)

# Geometrická řada

sl. 1	sl. 2
<b>A</b> ŘED.R.	<b>A</b> ŘED.R.
<b>B</b> ŘED.R.	<b>B</b> ŘED.R.
<b>C</b> 1:2	<b>C</b> 1:2
<b>D</b> 1:4	<b>D</b> 1:4
<b>E</b> 1:8	<b>E</b> 1:8
<b>F</b> 1:16	<b>F</b> 1:16
<b>G</b> 1:32	<b>G</b> 1:32
<b>H</b> H <sub>2</sub> O	<b>H</b> H <sub>2</sub> O



Do jamky vždy jen 100ul z naředěné geom. řady.

Zbytek destičky dopipetovat ředícím roztokem:

sl. 3-5 - dopipetovat 8-kanálovou pipetou

sl. 6-8 – dopipetovat opakovací pipetou (=stepper)

sl. 9-11 - dopipetovat 1-kanálovou pipetou

# PROTOKOLY

v hlavičce:

jméno  
datum  
úloha č.  
název úlohy

v protokolu samotném:

Princip  
Postup  
Výsledky  
Závěr

...grafy...

# PROTOKOL Č.1

- **Princip:** Okomentovat význam správného pipetování
- **Postup:** pomůcky, schémátka
- **Do výsledků:** min. hodnota, max. hodnota, průměr, směrodatnou odchylku jen u absorbancí nenáležících ke geometrické řadě (sl.3-11)