

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGICA  
DISCIPLINA ENGENHARIA TECIDUAL  
PROFª FERNANDA NEDEL

# CULTIVO CELULAR: PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Fernanda Leal; Tainã Cardoso

# Histórico

- Prêmio Nobel (1984): As teorias sobre a especificidade e controle do sistema imunológico e a descoberta do princípio para a produção de anticorpos monoclonais.



Niels K. Jerne



Georges J.F. Kohler



César Milstein

## Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

G. KÖHLER & C. MILSTEIN

MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK

**THE** manufacture of predefined specific antibodies by means of permanent tissue culture cell lines is of general interest. There are at present a considerable number of permanent cultures of myeloma cells<sup>1,2</sup> and screening procedures have been used to reveal antibody activity in some of them. This, however, is not a satisfactory source of monoclonal antibodies of predefined specificity. We describe here the derivation of a number of tissue culture cell lines which secrete anti-sheep red blood cell (SRBC) antibodies. The cell lines are made by fusion of a mouse myeloma and mouse spleen cells from an immunised donor. To understand the expression and interactions of the Ig chains from the parental lines, fusion experiments between two known mouse myeloma lines were carried out.

---



doi:10.1016/0022-1759(80)90148-5 | [How to Cite or Link Using DOI](#)

[Permissions & Reprints](#)

Review article

## Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics

S.Fazekas de St. Groth, Doris Scheidegger

Basel Institute for Immunology, 4005 Basel, Switzerland

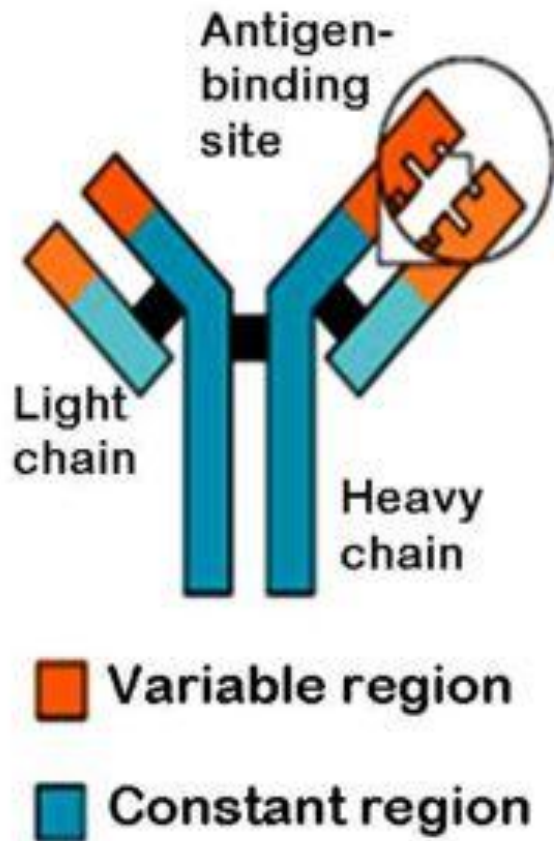
Received 15 January 1980; Accepted 3 February 1980. Available online 12 November 2002.

### Abstract

A myeloma line has been developed which produces no globulin chains of its own, has a duplication time of 8.7 h, fuses effectively with B-lymphoblasts and produces stable hybrids.

An enhancing effect of macrophages on hybridoma yields has been observed. Among the fusing agents tested, PEG of mol.wt. 4000 gave the best results, 20°C being the optimum working temperature. The

# ANTICORPO



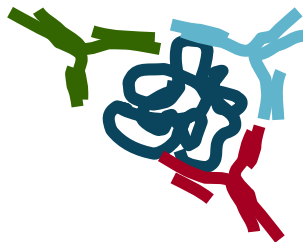
- ✓ Neutralização
- ✓ Aglutinação
- ✓ Precipitação
- ✓ Ativação do sistema complemento
- ✓ Intensificação direta da fagocitose

# ANTICORPOS

Policlonal



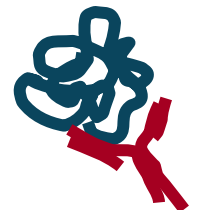
Reconhece  
**múltiplos** sítios  
antigênicos



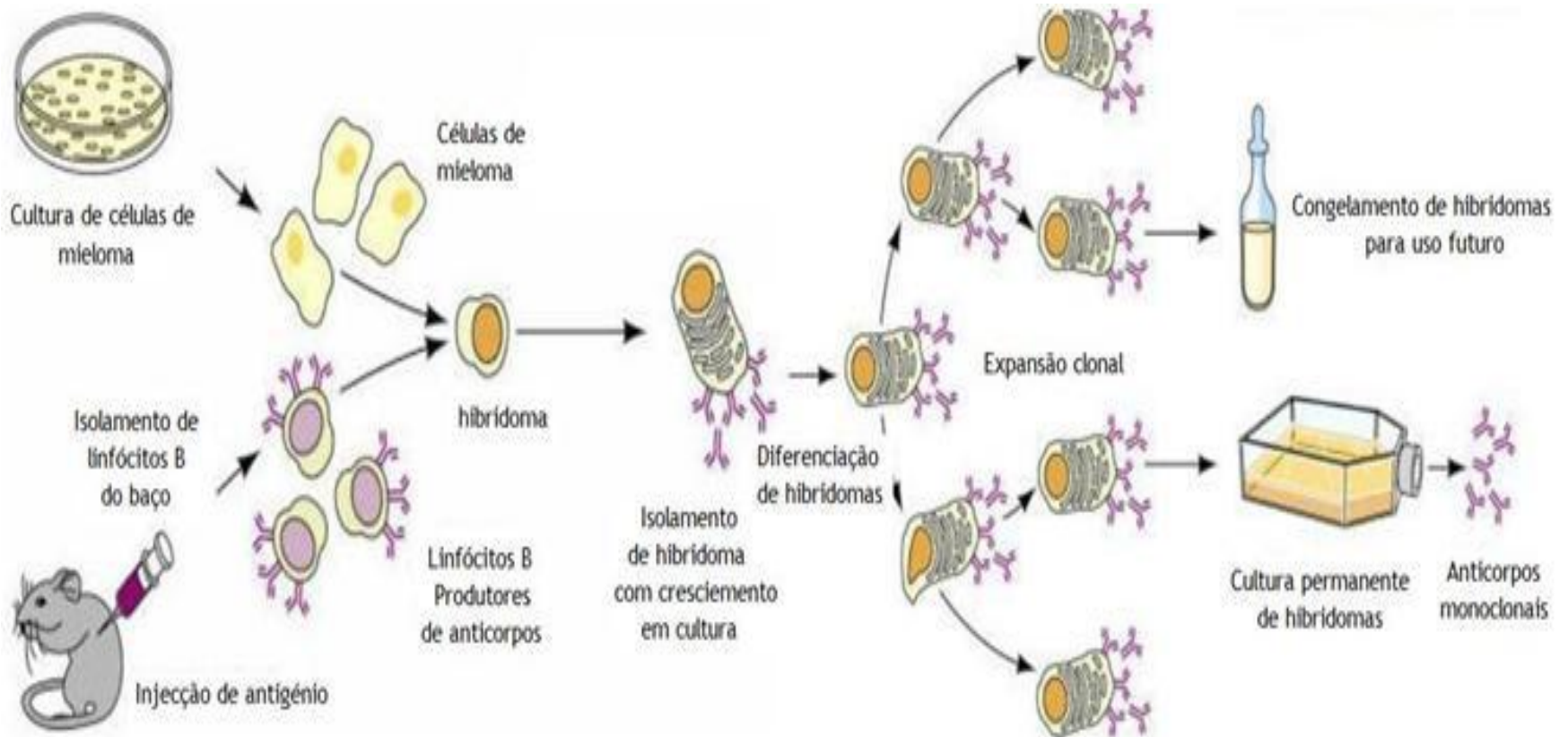
Monoclonal



Reconhecer  
**um** sítio  
antigênico



# Etapas



# ETAPA 1

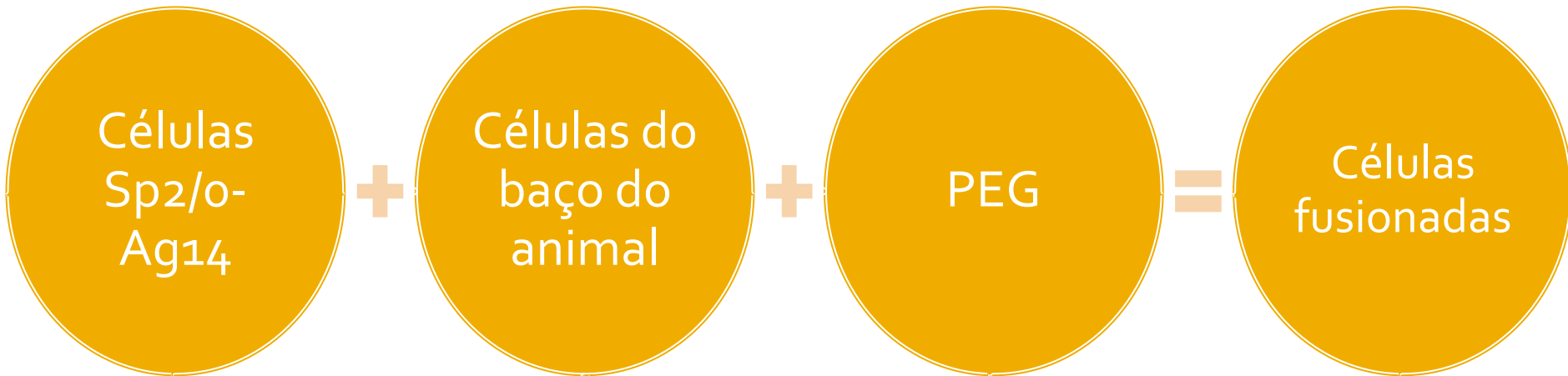
- **Imunização:**
  - Peptídeos e proteínas → com adjuvante
  - Células → sem adjuvantes
- **Várias doses**
- **ELISA**





# ETAPA 2

- Fusão e Seleção dos Hibridomas:



# ETAPA 2

- Seleção dos hibridomas:
- Mielomas deficientes na enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HGPRT):
  - Síntese de nucleotídeos de DNA pela via de salvação
- Inibição da via de novo da síntese de nucleotídeos
  - Aminopterina, metotrexato, azaserine

### *De novo* Pathway

PHOSPHORIBOSYL PYROPHOSPHATE

+  
URIDYLATE



==== Aminopterin



### Salvage Pathways

THYMIDINE



*Thymidine kinase (TK)*

HYPOXANTHINE



*Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT)*

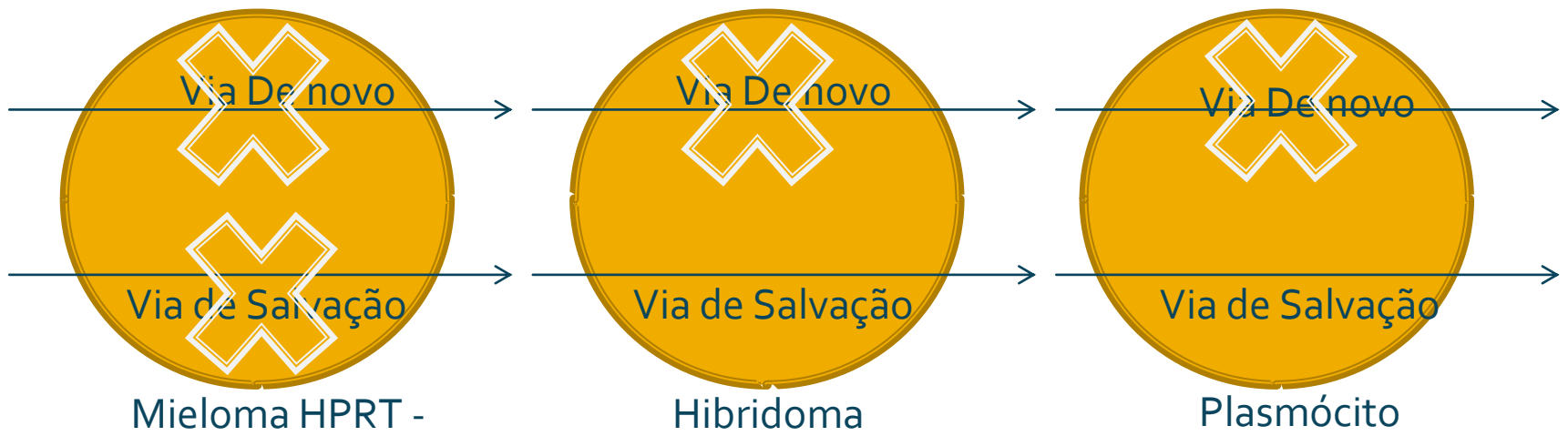
ENZYMES ABSENT IN  
MUTANT MYELOMA LINES  
USED FOR FUSIONS



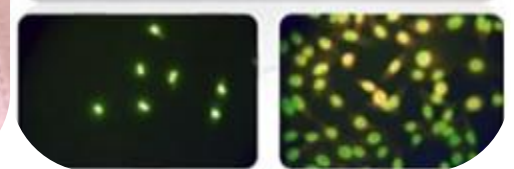
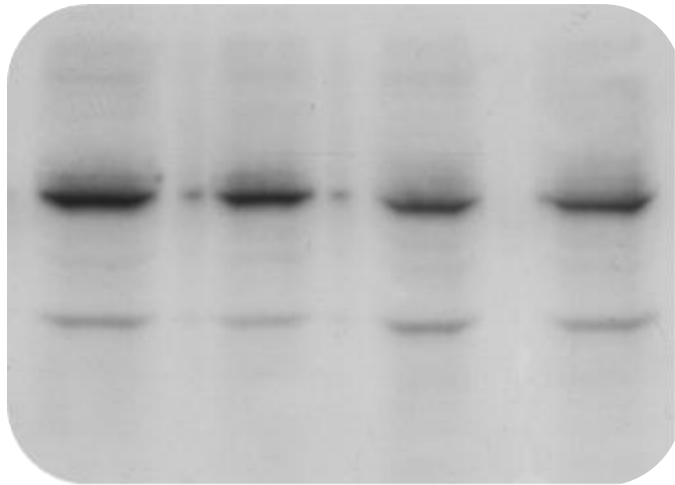
NUCLEOTIDES

A

- Meio HAT:
  - Hipoxantina
  - Timidina
  - Aminoptericina

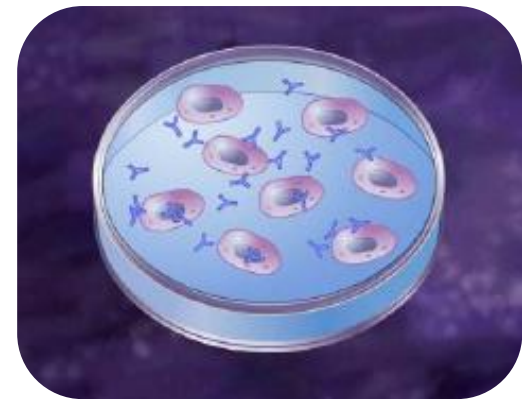
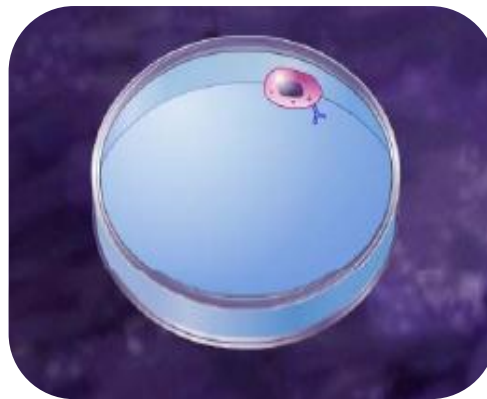
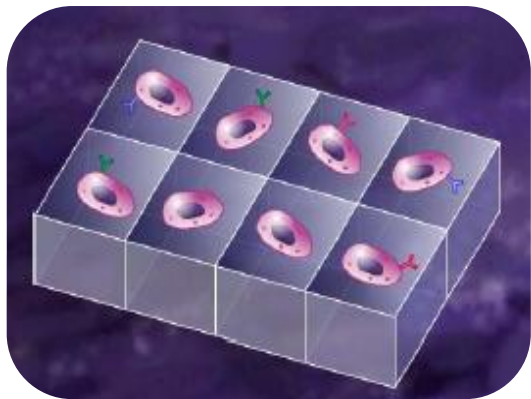


- Seleção dos Hibridomas:
  - Antígenos de Superfície celular: Imunofluorescência e ELISA
  - Antígenos proteicos: ELISA e *Western Blot*



# ETAPA 3

- Clonagem dos Hibridomas:
- Diluição Limitante
- Expansão dos clones





# ETAPA 5

- Produção de tumores ascíticos:
  - Administração do hibridoma no camundongo



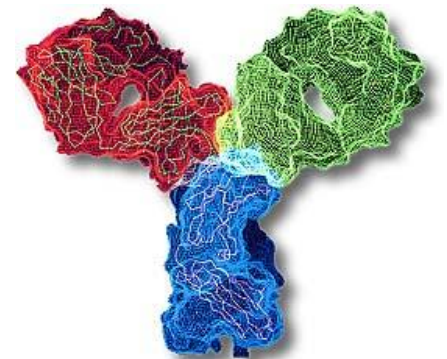


# ETAPA 5

- Purificação dos Anticorpos
  - Proteína G
  - Proteína A
- Conjugação
- Aumento de Escala

# USO Ac MONOCLONAL

- Detecção e tratamento de câncer
- Imunização passiva
- Testes diagnósticos
- Insumos laboratoriais



# VANTAGENS DOS AcM

- Sem variação de lote a lote.
- Alta capacidade produtiva.
- Baixo custo para produção.
- Capacidade de selecionar Ac com características imunoquímicas desejáveis.
- Excelentes para diagnóstico.

# DESVANTAGENS

- Os anticorpos monoclonais MURINOS

**Terapia ineficiente**



HAMA ("Human Anti-Mouse Antibody")

# ANTICORPO RECOMBINANTE

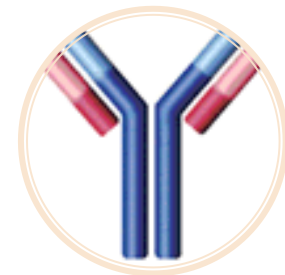
- Anticorpo quimérico
- Recombinação gênica por enxerto – substitui as regiões de complemento (CDR)

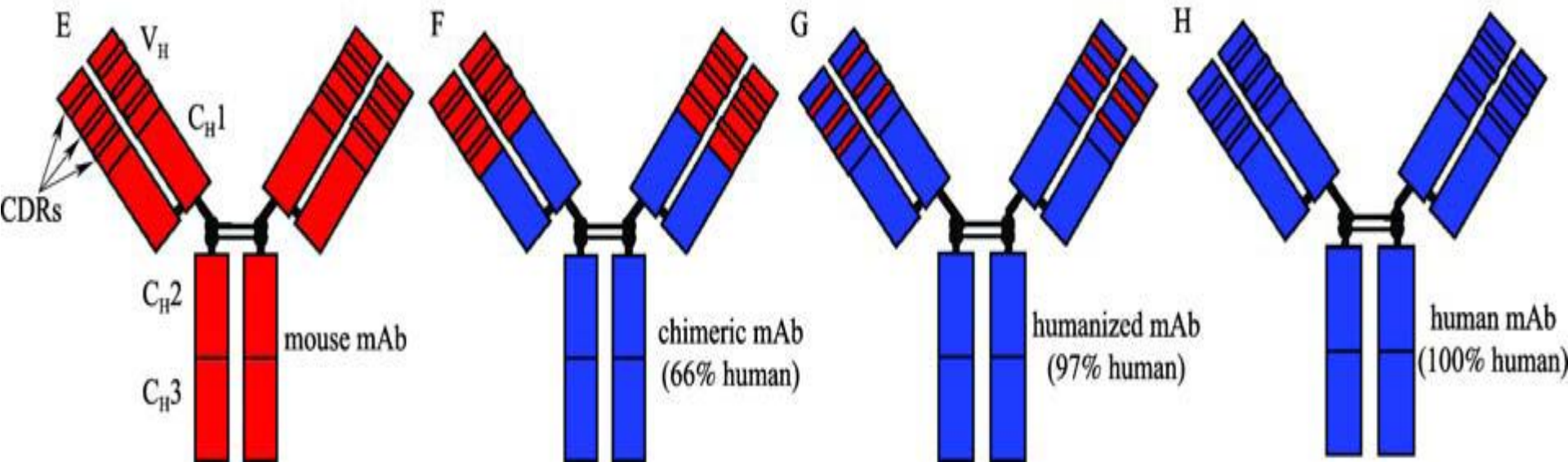
# ANTICORPO HUMANIZADO

- Camundongos transgênicos
  - › Introdução de segmentos de DNA
  - › Minicromossomos



- Fragmentos de Anticorpos
  - › Construção de bibliotecas
  - › Fagos





- FONTE: Zhiqiang Na. Monoclonal antibodies – a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. Protein Cell 2010

# LINHAGENS



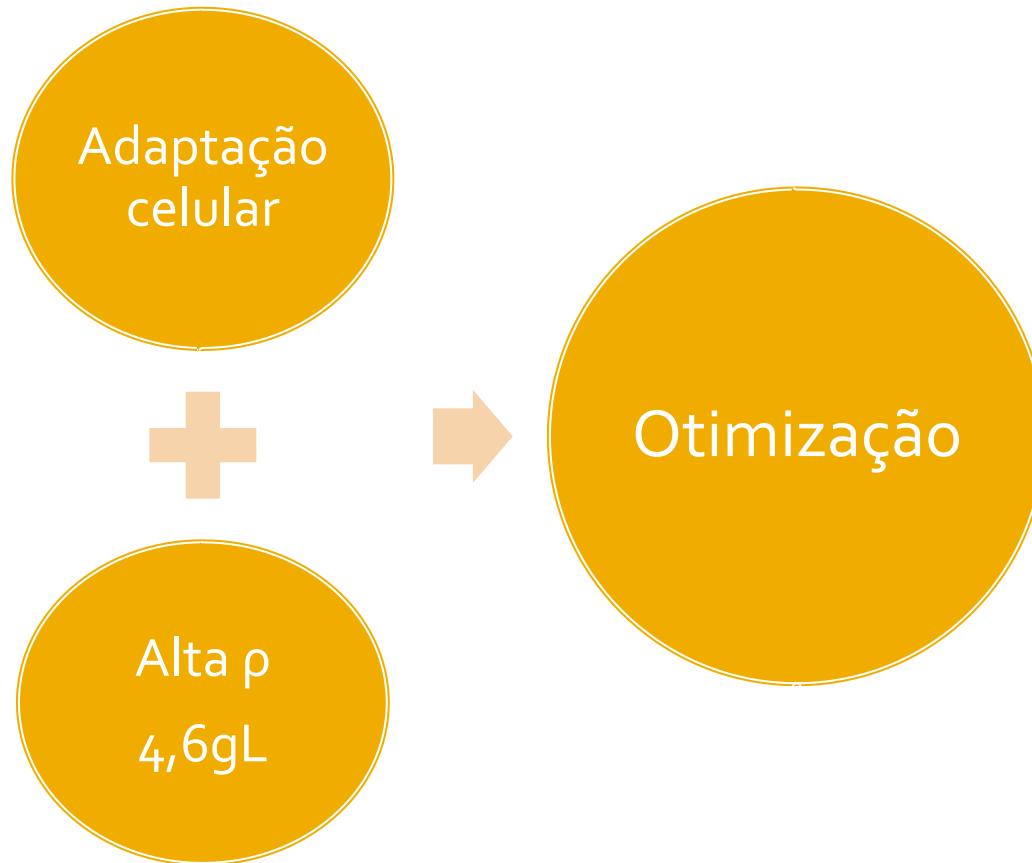
- Híbridomas

- CHO; NOS; Sp2/o; BHK;  
HEK293; PER-C6



# SISTEMA DE PRODUÇÃO

- Cultivo *in vitro*



# CULTIVO *IN VITRO*

- Meios complexos
- Taxas de Oxigênio dissolvido
- Agitação
- Modo descontínuo
- Concentração celular
- Adição de fatores de crescimento , citocina...

# PRODUTOS COMERCIAIS



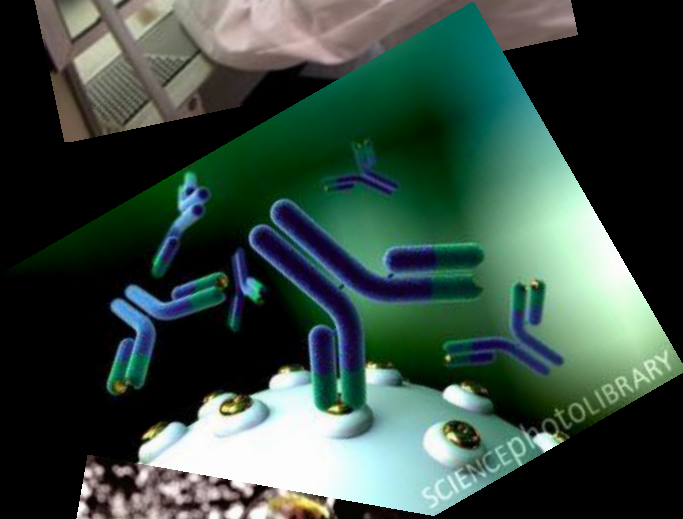
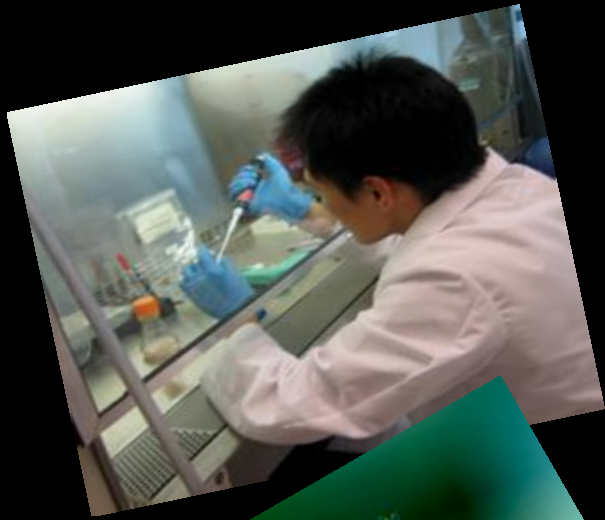
Herceptin® - Expresso em CHO – aderente. Humanizado



Mabthera® - Expresso em CHO ou SP2/o Suspensão - Quimérico



Bexxar® - expresso em células murinas



**OBRIGADA!**