

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Příprava agonistické myší monoklonální protilátky proti
lidskému CD40 antigenu**

Diplomová práce

Bc. Pavla Šoffrová

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2022

Šoffrová, P., 2022: Příprava agonistické myší monoklonální protilátky proti lidskému CD40 antigenu. [Preparation of agonistic mouse monoclonal antibody against the human CD40 antigen. Mgr. Thesis, in Czech.] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Cancer is the second most common cause of death worldwide. For this reason, a considerable emphasis is placed on the development of new treatments. It turns out that the CD40/CD40L dyad, which plays an important role in many immune processes, is a promising target for cancer immunotherapy. The aim of the thesis was to prepare monoclonal antibodies against the CD40 receptor by using hybridoma technology and characterization of prepared antibodies as agonistic and antagonistic by their effect on the B lymphocyte and monocyte cell line.

Prohlašuji, že jsem autorem této diplomové práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 7. 12. 2022

.....

Bc. Pavla Šoffrová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za pomoc, odborné rady a připomínky, bez kterých by tato práce nevznikla. Déle bych chtěla poděkovat Ing. Evě Výletové, Mgr. Aničce Kovaříkové, Mgr. Zuzaně Beránkové a Mgr. Adéle Chlastákové PhD., na které jsem se mohla v případě jakýchkoli problémů obrátit.

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Literární přehled.....	2
2.1	Receptor CD40.....	2
2.1.1	Struktura CD40.....	2
2.1.2	CD40+ buňky.....	2
2.2	Ligand CD40L.....	3
2.2.1	Struktura CD40L.....	3
2.2.2	CD40L+ buňky.....	3
2.3	Fyziologické procesy, kterých se CD40/CD40L účastní.....	4
2.3.1	Vliv na B lymfocyty.....	4
2.3.2	Vliv na dendritické buňky.....	4
2.3.3	Vliv na makrofágy.....	5
2.3.4	Tvorba germinálních center.....	5
2.3.5	Změna izotypu protilátek.....	5
2.3.6	Aktivace T lymfocytů pomocí APC.....	6
2.3.7	Vývoj Th1 a Th2 odpovědi.....	6
2.4	Patologické procesy, kterých se CD40/CD40L účastní.....	8
2.4.1	Ateroskleróza.....	8
2.4.2	Autoimunitní onemocnění.....	8
2.4.3	Infekce.....	9
2.5	Monoklonální protilátky proti CD40.....	10
2.5.1	Agonistické protilátky.....	10
2.5.1.1	Přímý vliv na nádorové buňky.....	10
2.5.1.2	Aktivace buněk zodpovědných za protinádorovou imunitu.....	11
2.5.1.3	Likvidace pomocí NK buněk a CTL.....	12
2.5.2	Antagonistické protilátky.....	13
2.5.2.1	Autoimunitní onemocnění.....	13
2.5.2.2	Transplantace.....	14
2.6	Využití agonistické protilátky v nádorové imunoterapii – MBTA terapie.....	15
2.6.1	Složky MBTA terapie.....	15
2.6.1.1	Mannan-BAM.....	15
2.6.1.2	TLR agonisté.....	16
2.6.2	MBT a MBTA terapie v léčbě nádorových onemocnění.....	16
3.	Cíle práce.....	18
4.	Materiál a metody.....	19
4.1	Materiál.....	19
4.1.1	Myš.....	19
4.1.2	Imunizace.....	19

4.1.3	Kultivační média	19
4.1.4	Buněčné linie	19
4.1.5	Hybridomová fúze	19
4.1.6	Roztoky pro metodu ELISA:	20
4.1.7	Reagencie použité pro charakterizaci protilátek	20
4.1.8	Ostatní materiál:	21
4.2	Metody	21
4.2.1	Hybridomová technologie	21
4.2.2	ELISA	23
4.2.3	Sledování proliferace B lymfocytů	24
4.2.4	Detekce IL-8 produkovaného monocyty pod vlivem agonistických Anti – CD40 MAbs	25
4.2.5	Detekce inhibice produkce IL-8 monocyty pod vlivem antagonistických anti – CD40 MAbs 26	
4.2.6	Sledování úmrtnosti monocytů pod vlivem antagonistických anti-CD40 MAbs	26
5.	Výsledky	27
5.1	Imunizace a hybridomová fúze	27
5.2	Proliferace B lymfocytů pod vlivem vytvořených protilátek	28
5.3	Stanovení produkce IL-8 monocyty	31
5.4	Inhibice produkce IL-8 antagonistickými protilátkami	34
5.5	Hynutí monocytů pod vlivem antagonistických protilátek	35
6.	Diskuse	37
7.	Závěr	41
8.	Seznam zkratk	42
9.	Reference	44

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou podle WHO celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. Z tohoto důvodu je vyvíjen obrovský tlak na vývoj nových léčebných postupů. V nynější době se výzkum léčby nádorových onemocnění zaměřuje na nádorovou imunoterapii a její kombinaci s chemoterapií, radioterapií, nebo chirurgickými postupy.

Jedním z cílů nádorové imunoterapie je dyáda CD40/CD40L, která se účastní mnoha fyziologických, ale i patologických procesů v organismu. Z tohoto důvodu se vytváří monoklonální protilátky proti CD40 receptoru.

Protilátky mohou být agonistického a antagonistického charakteru. Agonistické protilátky jsou perspektivní pro použití v nádorové imunoterapii. Mají vliv jak na přímou eradikaci nádorových buněk, tak aktivují antigen prezentující buňky, díky čemuž dochází ke spuštění kaskády, která končí aktivací cytotoxických T lymfocytů a jejich likvidací nádorové tkáně.

Naopak antagonistické protilátky tlumí aktivaci imunitního systému a jejich použití při léčbě autoimunitních onemocnění, nebo při prevenci odhojení štěpu po transplantaci, se jeví jako velice perspektivní.

2. Literární přehled

2.1 Receptor CD40

Receptor CD40 (FASRSF5) je členem TNF (tumor necrosis factor) rodiny a spojuje se se svým ligandem CD40L (Bossen et al., 2006, van Kooten & Banchereau, 2000). Do super rodiny TNF patří kromě receptoru CD40 a jeho ligandu CD40L (TNFSF5, TRAP) také OX40 (TNFRSF4) spolu s jeho ligandem OX40L (TNFSF4, gp34, TXGP1), FasL (TNFSF6) a mnoho dalších (Locksley et al., 2001).

2.1.1 Struktura CD40

Gen pro receptor CD40 se u lidí nachází na 20. chromozomu, konkrétně v oblasti q12–q13.2 a je kódován mRNA o velikosti 1,5 kb. U myších modelů byl gen pro tento receptor nalezen na 2. chromozomu (Ramesh et al., 1993). Membránový protein vzniklý z mRNA je složený z několika částí – signální sekvence (22 aminokyselin), extracelulární domény (171 aminokyselin), transmembránové domény (22 aminokyselin) a cytoplazmatické domény (62 aminokyselin). CD40 receptor se vyznačuje repetitivní sekvencí čtyř subdomén obohacených o cystein. Obvykle je jich v každé subdoméně 6 a vytváří 3 disulfidické domény. Toto uspořádání je typické pro členy TNF rodiny, avšak intracelulární doména se strukturou TNF rodině nepodobá (Schönbeck & Libby, 2001). Receptor CD40 má velikost okolo 50 kDa a poprvé byl objeven na povrchu B lymfocytů, kde byl pojmenován jako Bp50 (Noelle et al., 1992).

2.1.2 CD40+ buňky

Receptor CD40 je exprimován na antigen prezentujících buňkách (APC), konkrétně na monocytech (Alderson et al., 1993), dendritických buňkách a B lymfocytech. Krom antigen prezentujících buněk je tento receptor exprimován i na dalších imunitních buňkách – eosinofilních a bazofilních granulocytech a makrofázích (Schönbeck & Libby, 2001). Zároveň je exprimován i na buňkách mimo imunitní systém (van Kooten & Banchereau, 2000). Mezi tyto buňky se řadí endoteliální buňky, epiteliální buňky, buňky hladké svaloviny, fibroblasty a keratinocyty (Schönbeck & Libby, 2001).

2.2 Ligand CD40L

2.2.1 Struktura CD40L

CD40L označovaný jako gp39 nebo CD154 je protein o velikosti 39 kDa (Foy et al., 1993). Gen pro CD40L je uložený na chromozomu X, konkrétně v oblasti q26.3–q27.1. Skládá se z pěti exonů a čtyř intronů. Celková délka genu je kolem 13 kb. Lidský CD154 se vyznačuje vysokou homologií s genem objeveným u myši. Shoda v kódující sekvenci odpovídá 77,4 % (Gauchat et al., 1993).

CD40L je řazen do TNF rodiny. (Locksley et al., 2001) Jedná se o transmembránový protein II. typu mající strukturu trimeru. Je kódován 261 aminokyselinami, které vytváří 3 domény. Cytoplazmatickou doménu tvoří 22 aminokyselin, transmembránovou 24 aminokyselin a 215 aminokyselin tvoří extracelulární doménu (van Kooten & Banchereau, 2000).

2.2.2 CD40L+ buňky

Ligand CD40L je exprimován na T a B lymfocytech, bazofilních a eosinofilních granulocytech, NK (natural killer) buňkách, mastocytech, krevních destičkách, makrofázích, dendritických buňkách, epitelálních a endotelálních buňkách a buňkách hladké svaloviny (Schönbeck & Libby, 2001).

Trombocyty exprimují obrovské množství CD40L po jejich aktivaci (Henn Volker et al., 1998). CD40L je uložen v cytoplazmě, konkrétně v α -granulích trombocytů (Charafeddine et al., 2012). Trombocyty jsou také schopny uvolňovat rozpustný CD40L (sCD40L), který vzniká štěpením membránového CD40L pomocí metaloproteináz. Molekula je štěpena v oblasti mezi transmembránovou doménou a CD40 vazebnou TNF homologní doménou membránové formy ligandu (Mcwhirter et al., 1999).

Bazofilní granulocyty se fyziologicky účastní alergických reakcí. Ligand CD40L je detekovatelný na těchto buňkách ještě před setkáním s alergenem, ale po kontaktu se na povrchu buněk objevuje zvýšené množství CD40L molekul. Tento jev je možné pozorovat i při imunoterapii, během které dochází k vystavení jedince malému množství alergenu (Siegmond et al., 2000).

Eosinofilní granulocyty exprimují CD40L na svém povrchu po aktivaci. Ve srovnání s aktivovanými T lymfocyty je množství exprimovaných CD40L u eosinofilních granulocytů nízké. Jedinci, kteří trpí hypereosinofilií, vykazují na povrchu neaktivovaných eosinofilních granulocytů přítomnost CD40L, přestože za fyziologických podmínek není tento ligand na

neaktivovaných buňkách exprimován. Tato skutečnost ukazuje na účast eosinofilních granulocytů v prozánětlivých procesech (Gauchat et al., 1995).

CD154 je exprimován i žírnými buňkami. Pokud jsou tyto buňky v přítomnosti astrocytů, které exprimují CD40 receptor, dochází k jejich aktivaci a následné produkci prozánětlivých cytokinů. Tyto uvolněné mediátory jsou pak schopny reaktivovat astrocyty pomocí JAK1/2 – STAT1 signalizační kaskády. Tato interakce hraje roli ve vzniku neurodegenerativních onemocnění postihujících centrální nervovou soustavu, proto by interakce CD40/CD40L mohla být cílem léčby těchto onemocnění (Kim et al., 2011).

Neaktivované dendritické buňky exprimují CD40L a po jejich interakci s receptorem CD40 dochází ke zvýšení exprese genu CD154 a k zvýšené koncentraci CD154 molekul na povrchu dendritických buněk (Pinchuk et al., 1996).

NK buňky v přítomnosti IL-2 exprimují CD154 na svém povrchu. Po spojení s receptorem CD40 mohou mít vliv v likvidaci nádorových buněk u malignit odvozených od B lymfocytů (Carbone et al., 1997).

2.3 Fyziologické procesy, kterých se CD40/CD40L účastní

2.3.1 Vliv na B lymfocyty

Stimulace CD40 receptoru přítomného na B lymfocytech způsobuje zvýšenou expresi CD23 (Saeland et al., 1993), CD30 (Cerutti et al., 1998), CD80 a CD86 znaků (Sahoo et al., 2002). Interakce CD40 s jeho ligandem vyvolává produkci TGF- β a IL-10 B lymfocyty. Tato interakce také stimuluje produkci IgA molekul, které hrají roli ve slizniční imunitě proti patogenům (Zan et al., 1998).

2.3.2 Vliv na dendritické buňky

Dendritické buňky po stimulaci jejich CD40 receptoru pomocí ligandu CD154 maturují (van Kooten & Banchereau, 2000) a produkují vysoké množství IL-12 ve srovnání s dendritickými buňkami vystavenými LPS, TNF- α , nebo patogenům jako je *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, nebo *Pseudomonas aeruginosa* (Celia et al., 1996). Vyprodukovaný IL-12 dendritickými buňkami aktivuje TYK2, JAK2 a STAT dráhy, které vedou k vývoji Th1 buněk z CD4+ T lymfocytů (El-Shabrawi et al., 1998). Krom produkce IL-12 se maturací zvyšuje množství adhezivních molekul ICAM-1, znaků CD80, CD86 (Celia et al., 1996) a CD70 (Keir et al., 2007), které mají vliv na CD4+ T lymfocyty (Celia et al., 1996). Naopak dochází

k downregulaci inhibičních molekul PD–L1 (programmed cell death ligand) (Keir et al., 2007), IL–4 a IL–10 (Koch et al., 1996).

Po vyzrání dochází ke cross–prezentaci exogenních antigenů získaných z okolního prostředí. Tyto antigeny, resp. fragmenty, jsou prezentovány spolu s MHC (major histocompatibility complex) glykoproteiny 1. třídy CD8+ T lymfocytům. Díky tomuto kontaktu pak dochází k aktivaci cytotoxických T lymfocytů (Schoenberger et al., 1998).

2.3.3 Vliv na makrofágy

Makrofágy vykazují stejné reakce jako dendritické buňky. Produkují zvýšené množství IL–12 a snížené IL–4 a IL–10. Avšak na rozdíl od DC jsou schopny in vitro produkovat prozánětlivý protein TNF– α a metaloproteinázy (van Kooten & Banchereau, 2000). Při výzkumu Macha et al. (1997) bylo prokázáno, že lidské monocyty a makrofágy jsou schopny produkovat zvýšené množství tkáňového faktoru, pokud jsou v přítomnosti buněčných membrán CD4+ pomocných T lymfocytů. Krom toho se objevuje zvýšené množství CD40 antigenů na povrchu monocytů. Tento jev je způsoben cytokiny. Konkrétně IFN– γ , GM–CSF a IL–3 (Alderson et al., 1993).

2.3.4 Tvorba germinálních center

Vznik germinálních center je závislý na funkční interakci CD40/CD40L. Tato centra vznikají ve slezině a jsou místem vzniku paměťových a plazmatických buněk vyvinutých z B lymfocytů. Plazmatické buňky produkují protilátky. Pokud dojde k inhibici interakce CD40 s jeho ligandem na T lymfocytech, k tvorbě germinálních center nedochází a díky tomu nevznikají ani protilátky (Foy et al., 1994).

2.3.5 Změna izotypu protilátek

Funkční interakce CD40 receptoru na B lymfocytech s ligandem na T lymfocytech je důležitá pro změnu izotypu protilátek tvořených B lymfocyty. Bylo zjištěno, že myši mající deficit CD40 receptoru, jsou schopny vyvinout pouze IgM protilátky proti thymus dependentním antigenům. Zbylé izotypy protilátek, které vznikají izotypovým přesmykem z IgM už nejsou myši s mutací pro CD40 schopny vytvořit (Kawabe et al., 1994).

V případě, že dochází k tvorbě protilátky proti antigenům na thymu nezávislým, dochází k normální tvorbě IgM a následně i IgG molekul. Tato fakta ukazují, že interakce CD40 receptoru s jeho ligandem hraje roli i v protilátkových reakcích na patogeny (Kawabe et al., 1994).

CD30+ B lymfocyty v přítomnosti CD154 mění syntézu imunoglobulinů z IgM na IgG, IgA a IgE (Cerutti et al., 1998). Jedinci, kteří mají mutaci v genu pro CD154, trpí hyper IgM syndromem, pro který je typické zvýšení množství imunoglobulinů třídy M (IgM) a sníženým množstvím ostatních imunoglobulinových tříd v séru (Katz et al., 1996). Tento syndrom se projevuje častými infekcemi bakteriálního původu, protože nedochází k navázání CD40 na CD40L (Conley et al., 1994).

2.3.6 Aktivace T lymfocytů pomocí APC

T lymfocyty potřebují pro svoji aktivaci dva signály (Janeway & Bottomly, 1994). Prvním signálem je interakce T buněčného receptoru (TCR) přítomného na T lymfocytu spolu s MHC molekulou II. třídy přítomné na APC. Druhým potřebným signálem je interakce CD80 nebo CD86 znaku exprimovaného na APC s CD28 znakem přítomným na T lymfocytu (Ho et al., 1994).

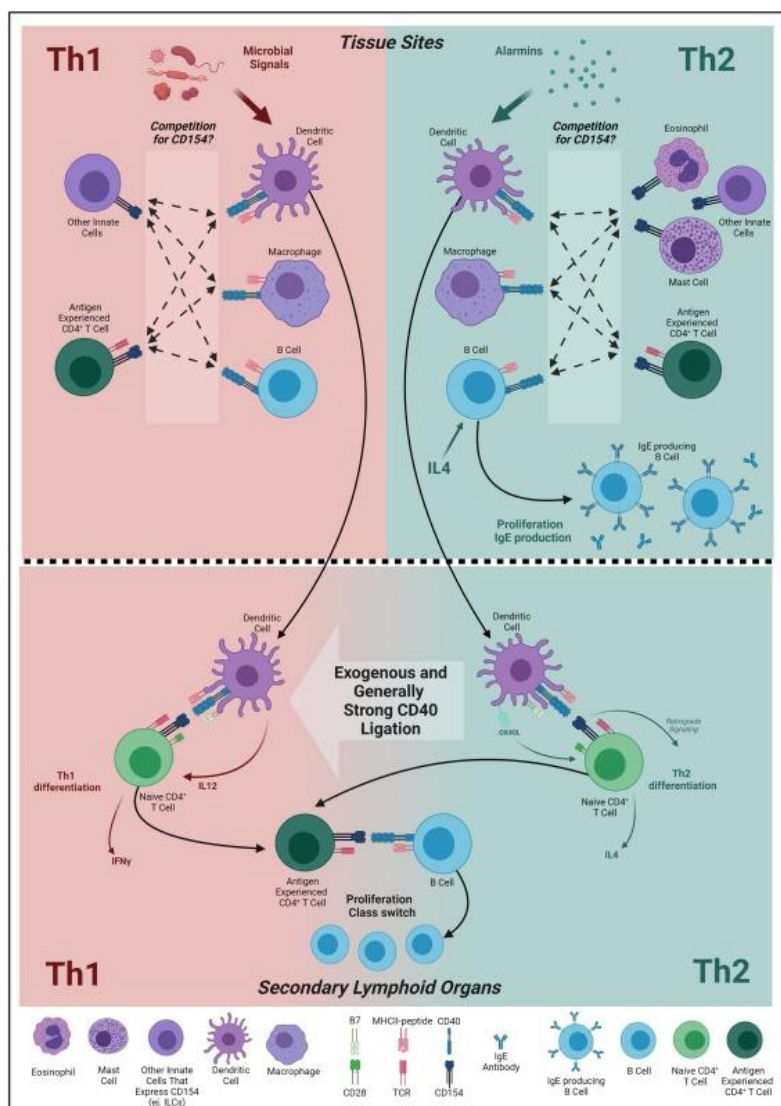
B lymfocyty patří mezi APC, ale lze je označit jako nekompetentní, protože v neaktivovaném stavu exprimují malé množství kostimulačních molekul, které jsou potřeba pro aktivaci T lymfocytů (Ho et al., 1994). Díky tomu, že neaktivované B lymfocyty exprimují CD40 na svém povrchu, dochází k aktivaci B lymfocytů pomocí T lymfocytů, které exprimují ligand tohoto receptoru. Po aktivaci začínají B lymfocyty exprimovat receptory pro kostimulační molekuly (Banchereau et al., 1991), IL-4 (W. E. Paul & Ohara, 1987) a IL-2 (Mingari M. C. et al., 1984), IL-5 a IL-10, které produkují T lymfocyty (Banchereau et al., 1994). Tímto procesem dojde k aktivaci B lymfocytů, které jsou schopny dát druhý signál CD4+ T lymfocytům, které se tímto procesem aktivují.

2.3.7 Vývoj Th1 a Th2 odpovědi

Pomocné T lymfocyty stimulují proliferaci B lymfocytů. Jsou toho schopny jak Th1, tak Th2 lymfocyty, ale pod vlivem Th2 T lymfocytů je proliferace B lymfocytů výrazně silnější (Brines & Klaus, 1993). Výzkumy také ukazují, že aktivace dendritických buněk vede k Th2 imunitní odpovědi u myších modelů. Aktivace Th1 odpovědi je pravděpodobně způsobena produkcí prozánětlivých cytokinů dendritickými buňkami, ale není závislá na interakci CD40/CD40L (MacDonald et al., 2002).

Interakce CD40 receptoru na dendritických buňkách s CD154 na T lymfocytech vede k indukci exprese OX40L na dendritických buňkách (Murata et al., 2000). OX40L reaguje s jeho receptorem OX40 přítomným na T lymfocytech. Ukazuje se, že tato interakce funguje

jako kostimulační signál pro indukci Th2 imunitní odpovědi (Jenkins et al., 2007). Tuto teorii podporuje i fakt, že Th2 lymfocyty po stimulaci exprimují větší množství OX40 na svém povrchu ve srovnání s Th1 buňkami. Efektorové CD4⁺ T lymfocyty v přítomnosti CD40L produkují významně zvýšené množství IL-4 a IL-5, které jsou typické právě pro Th2 odpověď (Croft et al., 1998). Tyto cytokiny způsobují zvýšenou proliferaci B lymfocytů (Walker & McKenzie, 2018). Uvedené informace z této kapitoly shrnuje obr. 1



Obr. 1: Th1 a Th2 imunitní odpověď na interakci CD40/CD154 (Díaz et al., 2021).

2.4 Patologické procesy, kterých se CD40/CD40L účastní

Interakce receptoru CD40 s jeho ligandem CD154 se účastní i patologických procesů v těle, mezi které lze zařadit aterosklerózu, autoimunitní onemocnění, nebo infekci patogenem (Schönbeck & Libby, 2001).

2.4.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění tepen, pro které je charakteristické hromadění lipidů a vznik aterosklerotických plátů, které mohou prasknout, což vede k ucpání tepny (Ussell & Oss, 1999).

Interakce CD40/CD40L se účastní prozánětlivých a pro-trombotických interakcí v organismu. V případě ligace CD40L s CD40 receptorem přítomným na endotelových buňkách, dochází k upregulaci adhezivních molekul, konkrétně VCAM-1, ICAM-1 a v neposlední řadě i E-selectinu (Nurden, 2011). Trombocyty ve svých granulích obsahují CD40L, který se po jejich aktivaci uvolňuje na povrch buňky. Zde dochází ke jeho štěpení a vzniku solubilního CD40L (sCD40L) (Schönbeck & Libby, 2001). Solubilní CD40L zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8) a metaloproteináz (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9) (Nurden, 2011). V přítomnosti CD40/CD40L také dochází k expresi tkáňového faktoru buňkami hladké svaloviny v cévách. Tento faktor je podstatný pro aktivaci koagulační kaskády a je přítomen i v aterosklerotických plátech. Tato interakce vede ke vzniku trombotických komplikací v těchto plátech, které mohou vyústit až v uzavření tepny trombem (Schönbeck et al., 2000). Zvýšené množství sCD40L je také spojeno s akutním koronárním syndromem, který je spojený s aterosklerózou (Tousoulis et al., 2010).

2.4.2 Autoimunitní onemocnění

CD40 spolu s CD86 a MHC molekulami II. třídy jsou exprimovány na povrchu epiteliálních buněk štítné žlázy při Gravesově–Basedowově nemoci, což pravděpodobně umožňuje prezentaci auto-antigenů T lymfocytům a zároveň poskytuje kostimulační signály (Peters et al., 2009). Gravesova–Basedowova nemoc je spojena s polymorfismem v jednom nukleotidu v tzv. Kozakově konsenzuální sekvenci, kdy u osob s variantou CC dochází ke zvýšené expresi CD40 na povrchu neaktivovaných B lymfocytů (Jacobson et al., 2005).

Pro roztroušenou sklerózu je typické, že do CNS migrují imunitní buňky, jako jsou T a B lymfocyty, makrofágy a mikroglie. Pod jejich vlivem dochází ke vzniku zánětu a demyelinizaci neuronů. Zničení tkáně je ale pravděpodobně způsobeno produkty imunitních

buněk, jako jsou např. protilátky, nebo může být zapojen komplement (Sospedra & Martin, 2005).

Systémový lupus erythematosus je onemocnění způsobené polyklonální aktivací B lymfocytů, které produkují autoprotilátky, konkrétně anti-ds-DNA protilátky (Nangaku & Couser, 2005). Dochází ke zvýšené expresi CD154 na povrchu CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocytů, ale i na B lymfocytech a monocytech. B lymfocyty, které exprimují CD154 spontánně produkují protilátky (Peters et al., 2009). Pro toto onemocnění je typické, že se objevuje lupusová nefritida, kdy dochází k ukládání komplexů autoprotilátek v ledvinách. Dochází k aktivaci komplementu a ke vzniku zánětlivé a cytotoxické reakce (Ortega et al., 2010).

Za nejvýznamnější zánětlivá onemocnění střev jsou považovány Crohnova choroba (Baumgart & Sandborn, 2012) a ulcerózní kolitida (Ordás et al., 2012). Pro obě tato onemocnění je typický zánět, kterého se účastní obrovské množství imunitních buněk (Baumgart & Sandborn, 2012; Ordás et al., 2012). Konkrétně se jedná o B lymfocyty, T lymfocyty a makrofágy, které ničí střevní epitel. Díky tomu dochází k typickým projevům těchto onemocnění (Peters et al., 2009). CD40 receptor je u nemocných exprimován na buňkách endotelu střev (Danese et al., 2006). Naopak jeho ligand je u postižených jedinců zvýšeně exprimován v periferní krvi a na povrchu CD4⁺ T lymfocytů, které jsou ve slizničním vazivu (Liu Zhanju et al., 1999).

2.4.3 Infekce

Dyáda CD40/CD154 hraje roli v imunitě proti patogenům. Bylo prokázáno, že interakce CD40 s CD154 je kritická pro odpověď proti infekci bakterií *Salmonella*. V případě, že dojde k deficitu CD154, nedochází k produkci NO a IFN- γ během akutní fáze onemocnění a bakteriální replikace není zastavena (Fernandez-Cabezudo et al., 2005). Velice podobné výsledky byly nalezeny u infekce *Leishmania major*, u které dochází u imunokompetentních jedinců k aktivaci makrofágů pomocí CD40 a k produkci IFN- γ (Kamanaka et al., 1996). U obou infekcí je důležitá Th1 odpověď proti patogenům (Fernandez-Cabezudo et al., 2005; Kamanaka et al., 1996).

U virových infekcí bylo zjištěno, že samotný ligand CD154 má protivirový účinek. Na myších modelech bylo prokázáno, že přítomnost CD154 je kritická pro imunitní odpověď, která zahrnuje protilátky IgG1 (Schönbeck & Libby, 2001).

2.5 Monoklonální protilátky proti CD40

Monoklonální protilátky proti CD40 receptoru mohou být agonistické a antagonistické (Grewa et al., 1996). Antagonistické anti-CD40 protilátky se napojují na receptor CD40 a inhibují tím navázání ligandu CD154. Díky tomu nemůže dojít ke spuštění signalizační kaskády a k fyziologické reakci na kontakt ligandu s receptorem (Luqman et al., 2008). Takové monoklonální protilátky podporují zánětlivé reakce a jsou zodpovědné za autoimunitní reakce (Grewa et al., 1996). Naopak agonistické monoklonální protilátky mají význam v nádorové imunoterapii (Turner et al., 2001).

2.5.1 Agonistické protilátky

Agonistické monoklonální protilátky namířené proti CD40 receptoru lze podle působení v léčbě nádorů, rozdělit podle mechanismů působení do dvou skupin. Prvním mechanismem je aktivace buněk, které se účastní protinádorové imunitní reakce. Druhým mechanismem je přímá eradikace nádorových buněk pomocí apoptózy, nebo na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity (ADCC) (Khong et al., 2012).

2.5.1.1 Přímý vliv na nádorové buňky

CD40 receptor se přirozeně vyskytuje na B lymfocytech a malignity vyvinuté z B lymfocytů mají na svém povrchu tento receptor také. Bylo prokázáno, že buňky akutní lymfatické leukémie exprimují méně CD40 než nonhodkinovské lymfomy, nebo chronická lymfatická leukémie. Naopak Fas receptor se vyskytuje jen u 15 % malignit odvozených od B lymfocytů, což je ve srovnání s fyziologickými B lymfocyty velice malé množství (Wang et al., 1997).

Anti-CD40 protilátka upreguluje expresi Fas receptoru (CD95) na B lymfocytech. FasR je známý jako receptor buněčné smrti a jeho gen se řadí do proapoptotických tumorsupresorových genů. Tento receptor spolu s jeho ligandem FasL dokáže vyvolat aktivaci indukovanou buněčnou smrt (AICD), nekrózu nebo zastavení buněčného cyklu. Tato interakce má za následek nekrózu nádorové tkáně, která na svých buňkách exprimuje Fas receptor (Wang et al., 1997).

CD40 receptor je široce rozšířený i na solidních nádorech. Během výzkumu Cooke et al. (1999) bylo zjištěno, že 78 % nádorů močového měchýře je CD40 pozitivních. Dále byl receptor CD40 nalezen i na buňkách rakoviny děložního čípku (Hess et al., 1999), ovárií (Gallagher et al., 2002), plic, prsu, tlustého střeva a nasofaryngu (Young et al., 1989). Na základě toho, že se receptor CD40 vyskytuje i na buňkách plicních nádorů, byl proveden pokus

s agonistickou anti-CD40 MAb na myších experimentálních modelech, které měly plicní nádory. Tento pokus vedl ke zjištění, že pod vlivem monoklonální protilátky dochází k eliminaci těchto nádorů (Bergstrom et al., 2004).

2.5.1.2 Aktivace buněk zodpovědných za protinádorovou imunitu

Agonistické protilátky aktivují antigen prezentující buňky, které následně aktivují cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty, které hrají obrovskou roli v eliminaci nádorové tkáně. Dalšími buňkami, které jsou schopné přímo ničit nádorové buňky, jsou NK buňky. I tato subpopulace lymfocytů je aktivována pomocí agonistické protilátky, kdy dochází k výraznému zvýšení jejich cytotoxické aktivity pod vlivem IFN- γ a IL-12 (Turner et al., 2001).

Dendritické buňky jsou považovány za nejdůležitější antigen prezentující buňky v nádorové obraně při použití anti-CD40 protilátky. V její přítomnosti dendritické buňky dozrávají a jsou schopné cross-prezentace. V důsledku toho dochází k upregulované expresi MHC molekul I. a II. třídy, CD80, CD86 a CD40 znaků stejně jako při interakci CD40/CD154. Dendritické buňky jsou schopny na svém povrchu prezentovat antigeny, které byly získány z nádorové tkáně. Takto zpracované znaky prezentují CD8⁺ T lymfocytům s MHC molekulami I. třídy (van Mierlo et al., 2004).

Agonistická anti-CD40 protilátka je schopna aktivovat a vyvolat silnou proliferaci B lymfocytů (Carpenter et al., 2009). Aktivované B lymfocyty fungují v nádorové imunitě stejně jako dendritické buňky – tj. aktivují cytotoxické T lymfocyty, které zabíjejí nádorové buňky (Buhmann et al., 1999).

Makrofágy po aktivaci pomocí anti-CD40 protilátky infiltrují nádorovou tkáň a mění se na makrofágy asociované s nádory. Zvyšuje se exprese MHC molekul II. třídy, ale také CD86 znaků. Mimo to dochází pod vlivem agonistické protilátky ke zvýšení koncentrace IL-12, TNF- α a IFN- γ v séru. U pankreatického adenokarcinomu jsou makrofágy zodpovědné za depleci stromatu nádorové tkáně. V této oblasti se objevuje snížené množství kolagenu I, což ukazuje na ničení tkáně. V případě, že organismus nedisponuje systémovými makrofágy, k depleci nádorové tkáně nedochází (Beatty et al., 2011). Anti-CD40 protilátka je schopna díky svému efektu na makrofágy a změně v morfologii pankreatu zvýšit účinnost PD-L1 blokády, která je používána v nádorové imunoterapii, ale ortotopický model pankreatického adenokarcinomu na tento postup, pokud je aplikován samotný, špatně odpovídá (Luheshi et al., 2016).

Nádorová tkáň je infiltrována antigen prezentujícími buňkami, z nichž 50 % je tvořeno makrofágy a T lymfocyty v obou subtypech – CD4+ a CD8+. Jejich zastoupení je velice podobné a ukazuje se, že CD4+ pomocné T lymfocyty mají vliv na eradikaci nádorů. CD4+ pomocné T lymfocyty produkují IL–2, který má vliv na aktivaci cytotoxických T lymfocytů (Marzo et al., 2000). Z výzkumů také vyplývá, že pokud je agonistická protilátka podána s IL –2, dochází ke zlepšení přežití a funkci T lymfocytů (Jackaman & Nelson, 2012).

Tumor–specifické CD8+ T lymfocyty, které jsou vystaveny licencovaným dendritickým buňkám pomocí anti–CD40 protilátky, produkují zvýšené množství IFN– γ (van Mierlo et al., 2004), o kterém je známo, že zmírňuje proliferaci nádorové tkáně. U některých nádorů, mezi které lze zařadit např. karcinom prsu, podporuje apoptózu a nekrózu nádorových buněk (Kochupurakkal et al., 2015).

2.5.1.3 Likvidace pomocí NK buněk a CTL

Cytotoxické T lymfocyty obsahují v lysozomech neaktivní lytické enzymy – perforiny a granzymy, které mohou působit společně, nebo každý zvlášť. Po interakci efektorové buňky s cílovou buňkou dochází k přesunu granul k povrchu T lymfocytu a exocytóze těchto enzymů k cílové buňce (Groscurth & Filgueira, 1998).

Monomery perforinů se vmezeří do buněčné membrány cílové buňky, dojde k polymerizaci a k vytvoření pórů v membráně. Tyto póry mohou sloužit jako vstup pro granzymy, nebo dochází ke zničení buňky osmotickou lýzou (Groscurth & Filgueira, 1998).

Granzymy vstupují do cílové buňky póry vytvořenými perforiny. Jedná se o skupinu serinových esteráz, které fragmentují DNA, což vede k apoptóze napadené buňky (Groscurth & Filgueira, 1998).

Druhým způsobem, kterým cytotoxické T lymfocyty zabíjí nádorové buňky, je interakce Fas ligandu na jejich povrchu s receptorem FasR, který je exprimovaný na řadě nádorových buněk. Jejich interakce vede k apoptóze cílové buňky (Groscurth & Filgueira, 1998).

NK buňky ve svých granulech obsahují také perforiny a granzymy a jejich působení proti nádorovým buňkám uplatňuje stejné principy jako CTL (S. Paul & Lal, 2017).

2.5.2 Antagonistické protilátky

2.5.2.1 Autoimunitní onemocnění

Dyáda CD40/CD154 hraje roli v mnoha autoimunitních onemocněních. Mezi ně patří experimentální autoimunitní encefalitida, revmatoidní artritida, zánětlivá střevní onemocnění, nebo systémový lupus erythematoses (Toubi & Shoenfeld, 2004).

Systémový lupus erythematoses

Antagonistická anti-CD40 monoklonální protilátka byla použita u myši s rozvinutou lupusovou nefritidou, která se projevovala proteinurií a nefritidou. Po aplikaci této protilátky došlo k vyléčení proteinurie a zánětu ledvin. Histologické preparáty ukázaly, že se struktura ledvinné tkáně vrátila do normálu, konkrétně se jednalo o glomeruly a tubuly ledvin. V případě, že byly protilátky podány dříve, než se proteinurie projevila, došlo k zabránění vzniku (Perper et al., 2019).

Antagonistická anti-CD40 protilátka je schopna zabránit vzniku autoreaktivních B lymfocytů, s tím související produkci autoprotištěk, ale také aktivaci T lymfocytů. Bylo tedy prokázáno, že užití monoklonálních protišťek může být použito v léčbě systémového lupusu u myši a je pravděpodobné, že stejným způsobem bude možné použít i lidské monoklonální protišťky u lidí (Perper et al., 2019).

Zánětlivá onemocnění střev

Byla vyvinuta lidská antagonistická monoklonální protišťka s názvem „ch5D12“, která byla použita k léčbě Crohnovy choroby u dobrovolníků starých 18–60 let. Po podání došlo ke snížení infiltrace v oblasti *lamina propria* a ke snížení aktivity nemoci ve střevě. Použití antagonistické anti-CD40 monoklonální protišťky má pro léčbu tohoto onemocnění velkou perspektivu (Kasran et al., 2005).

Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida je dalším z onemocnění, které dobře reaguje na použití antagonistické anti-CD40 protišťky. Po podání dochází ke snížení koncentrace IgG a IgA revmatoidního faktoru, také dochází ke snížení množství cirkulujících CD19+IgD-CD27-CD95+ B lymfocytů. Pod vlivem protišťky také dochází ke snížení koncentrace zánětlivých markerů, mezi které lze zařadit IL-6, MMP-3 (matrixová metaloproteináza 3). Přesto, že v tomto klinickém testování nedošlo k výrazným výsledkům, mohly by být protišťky slibnou cestou léčby tohoto onemocnění (Visvanathan et al., 2019).

Experimentální autoimunitní encefalitida

Toto zánětlivé onemocnění je používáno jako model roztroušené sklerózy. Primátům *Callithrix jacchus* byla podávána antagonistická anti-CD40 protilátka „ch5D12“ (zminěná již u léčby Crohnovy choroby) poté, co jim byl aplikován rekombinantní lidský myelinový oligodendrocytový glykoprotein, který vyvolává vznik encefalitidy. V porovnání s kontrolní skupinou nedošlo u primátů, kterým byla protilátka podána, k rozvinutí symptomů onemocnění. Také byla utlumena produkce IgM protilátek proti glykoproteinu, kterým byly primáti imunizováni před léčbou a k opoždění IgG odpovědi. U kontrolní skupiny byla nalezena významná demyelinizace v CNS, u léčené skupiny nebyly pozorovány téměř žádné změny. Z těchto pozorování vyplývá, že blokáce CD40 receptoru u pacientů trpících roztroušenou sklerózou je velice slibný způsob léčby tohoto onemocnění (Boon et al., 2001).

2.5.2.2 Transplantace

Krom autoimunitních onemocnění hraje dyáda CD40/CD154 roli v odhojení štěpu. Je to způsobeno reakcí T lymfocytů, které interagují s B lymfocyty a dalšími antigen prezentujícími buňkami (Cordoba et al., 2015). Po transplantaci štěpu, který je inkompatibilní v MHC dochází k odhojení transplantované tkáně. Podáním antagonistické anti-CD40 protilátky ch5D12 dochází k zabránění odmítnutí štěpu. Toto bylo otestováno na primátech (*Macaca mulatta*), kterým byly transplantovány inkompatibilní ledviny. U makaků, kteří dostávali dostatečné dávky antagonistické protilátky, došlo k výraznému prodloužení přežití transplantátu. Zároveň bylo zjištěno, že pokud dojde k podání anti-CD40 spolu s anti-CD86 protilátkou, dojde ještě ke většímu zmírnění imunitní reakce na inkompatibilní tkáň (Haanstra et al., 2003). Stejně výsledky byly pozorovány i po podání plně lidské 4D11 antagonistické protilátky primátům (*Mocaca fascicularis*). U této protilátky nebyly ani zaznamenány vedlejší účinky, které by se projevíly na změnách v krevním obrazu, nebo biochemických markerech jako jsou např. hladiny jaterních enzymů (Aoyagi et al., 2009).

2.6 Využití agonistické protilátky v nádorové imunoterapii – MBTA terapie

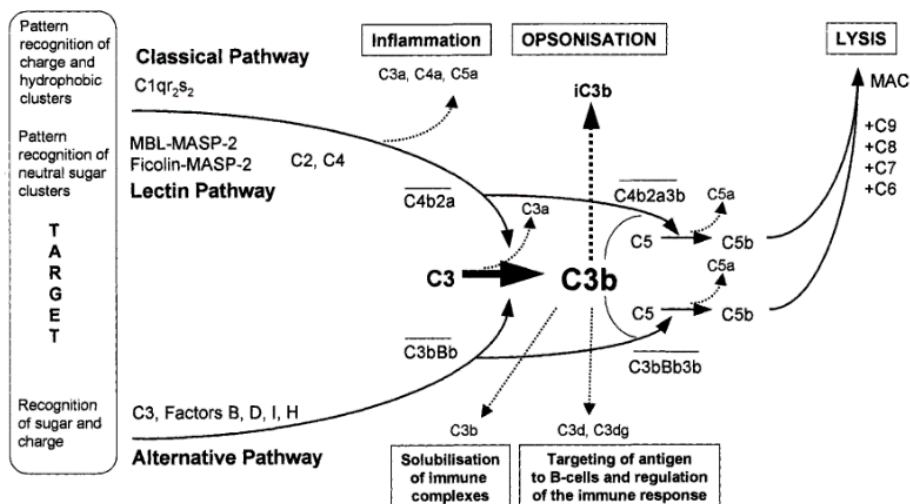
MBTA nádorová imunoterapie je založena na kooperaci tří složek. Jedná se o mannan–BAM, TLR agonisty a anti-CD40 protilátku. Tato terapie se vyvinula z původní MBT terapie, která se skládala pouze z mannan–BAMu a TLR agonistů. Anti-CD40 protilátka byla do terapie přidána později (Caisova et al., 2019).

2.6.1 Složky MBTA terapie

2.6.1.1 Mannan–BAM

Mannan je polysacharid získávaný ze *Saccharomyces cerevisiae* (Caisova et al., 2019), který funguje jako antigen rozpoznávaný pomocí vrozené imunity. Tento polysacharid spolu s lipopolysacharidem a glykany patří do skupiny konzervovaných molekulových vzorů, konkrétně je řazen mezi PAMP's a je rozeznáván pomocí MBL (mannan vázající lektin). (Janeway & Medzhitov, 2002) Interakce mannanu spolu s MBL spouští lektinovou cestu komplementu, která vede k opsonizaci a následné fagocytóze pomocí neutrofilních granulocytů, makrofágů a dendritických buněk (Obr. 2) (Presanis et al., 2003).

BAM je biokompatibilní kotva pro buněčnou membránu (Biocompatible Anchor for Cell Membrane). V terapii je používána k ukotvení mannanu na nádorové buňky (Caisova et al., 2019).



Obr. 2: Znárodnění lektinové cesty komplementu (Presanis et al., 2003).

2.6.1.2 TLR agonisté

TLR (toll-like receptor) agonisté se v MBTA terapii používají pro signalizaci a následnou infiltraci nádorové tkáně granulocytárními buňkami, které vyvolávají zánětlivou reakci (Caisova et al., 2019).

MBTA terapie používá tři TLR ligandy. Jedná se o Resiquimod (R-848), polyinosinovou-polycytidylovou kyselinu (poly(I:C)) a kyselinu lipoteichoovou (LTA) (Caisova et al., 2019).

Resiquimod je agonistou lidských TLR7 a TLR8 a myších TLR7. Lidský TLR7 je nevíce zastoupen na plazmacytoidních dendritických buňkách a B lymfocytech. Naopak na T lymfocytech, monocytech a NK buňkách je přítomnost TLR7 minimální. TLR8 se vyskytuje na monocytech (Hornung et al., 2002). Vazba resiquimodu na jeho agonisty způsobuje produkci cytokinů. Dendritické buňky produkují IL-6, IL-12, TNF- α a IFN- α (Ahonen et al., 1999). Monocyty a makrofágy produkují kromě již zmíněných cytokinů i IL-1 (Wagner et al., 1999).

Polyinosinová-polycytidylová kyselina interaguje s receptorem TLR3, který se běžně vyskytuje na B lymfocytech, monocytech a neimunitních buňkách mezi které patří keratinocyty, epitelární a endoteliální buňky nebo nádorové buňky (Zhou et al., 2014).

Kyselina lipoteichoová je posledním z TLR agonistů, které jsou v MBTA terapii používané (Caisova et al., 2019). Tato kyselina je získávána z gram-pozitivních bakterií (Kawamura Nobuko et al., 1995) a funguje jako agonista TLR2 (Draing et al., 2006). V reakci na LTA dochází k produkci prozánětlivých cytokinů mezi které lze zařadit např. TNF- α (Schwandner et al., 1999) a k produkci NO makrofágy (Hattori et al., 1997).

2.6.2 MBT a MBTA terapie v léčbě nádorových onemocnění

MBT terapie byla použita pro léčbu myšího melanomu, kde pod jejím vlivem došlo k 75% eliminaci nádorových buněk ve srovnání s kontrolou a k 83,3% přežití. U některých myší byla po retransplantaci nádorových buněk pozorována dlouhodobá ochrana proti melanomu (Caisová et al., 2016).

MBT terapie byla použita pro léčbu feochromocytomu. Bylo zjištěno, že dochází k inhibici růstu nádorové tkáně ve srovnání s kontrolní skupinou. Pod vlivem této terapie také dochází k více než dvojnásobnému prodloužení doby přežití léčených myší a byla pozorována infiltrace nádorové tkáně pomocnými i cytotoxickými T lymfocyty. Výsledky terapie tohoto nádorového onemocnění byly porovnány s MBTA terapií. Bylo zjištěno, že díky

použití anti-CD40 protilátky dochází ke zlepšení dlouhodobého přežití myší ve srovnání s MBT terapií. Zároveň došlo u více než 60 % myší léčených MBTA terapií ke kompletní eliminaci nádorů (Caisova et al., 2019). Během další studie věnující se feochromocytomu bylo zjištěno, že dochází k infiltraci primárních nádorů neutrofily, které ale nepronikají do distálních tumorech k infiltraci nedošlo. Dendritické buňky infiltrovaly po druhé dávce terapie oba typy nádorů (Uher et al., 2021b).

MBTA terapie byla použita i pro léčbu pankreatického adenokarcinomu, kde došlo u 67 % myší k úplné eradikaci nádorů. Po retransplantaci došlo ke vzniku malých nádorů, které byly imunitním systémem kompletně eliminovány (Uher et al., 2021a).

V neposlední řadě byla MBTA terapie testována i na karcinomu tlustého střeva. Došlo k prodloužení přežití myší, které byly léčeny touto terapií. V tomto případě došlo k infiltraci primárních i distálních nádorů lymfocyty (Medina et al., 2020).

3. Cíle práce

1. Připravit myší monoklonální protilátky proti lidskému antigenu CD40.
2. Ze získaných protilátek vybrat ty, které aktivují lidské B lymfocyty a monocyty (agonistické protilátky).
3. Charakterizovat efekt antagonistických anti-CD40 protilátek.

4. Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Myš

Pro imunizaci byla použita myš BALB/c (Velaz s.r.o.). Tato myš byla chována ve standardních podmínkách ve zvěřinci Katedry medicínské biologie na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

4.1.2 Imunizace

Pro imunizaci byl použit rekombinantní lidský CD40 antigen (Sino Biological), který byl rozpuštěn v deionizované vodě, celková koncentrace byla 100 µg/400 µL.

Antigen byl podáván s Kompletním a Inkompletním Freudovo adjuvans (Sigma-Aldrich).

4.1.3 Kultivační média

Kompletní kultivační médium: RPMI 1640 s 10 % bovinního fetálního séra (BOFES), 0,1 % 2–merkaptoetanolu, L–glutamin, 1 % antibiotik (penicilin G, streptomycin, fungizon) (vše Biowest).

Kultivační médium bez séra: RPMI 1640, 0,1 % 2–merkaptoetanolu, L–glutamin 1 % antibiotik (penicilin G, streptomycin, fungizon) (vše Biowest).

4.1.4 Buněčné linie

Bylo použito několik buněčných linií, které byly kultivovány v kompletním kultivační médiu. Veškeré linie byly pasážovány při konfluenci okolo 80 %, bylo jim odebráno staré médium a ke 2 ml buněčné suspenze bylo přidáno dostatečné množství čerstvého média.

SP2/0–Ag14 buněčná linie je myší myelomová linie, která byla použita pro fúzi se splenocyty.

RAJI je lidská buněčná linie B lymfocytů získaná z Burkittova lymfomu.

THP–1 je lidská buněčná linie monocytů získaná od pacienta trpícího akutní leukémií.

4.1.5 Hybridomová fúze

Během hybridomové fúze byl použit kromě kultivačního média PEG 1500 (polyethylenglykol 1500) (Sigma-Aldrich) a také HAT zásobní roztok (Sigma-Aldrich).

Pro kultivaci produkčních kolonií bylo použito kultivační médium s HT zásobním roztokem (Sigma-Aldrich).

Oba zásobní roztoky byly rekonstituovány v destilované vodě dle návodu dodavatele. Do 100 ml kultivačního média byly přidány 2 ml HT nebo HAT roztoku.

Pro mražení hybridomových kolonií byl použit dimethyl sulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich).

4.1.6 Roztoky pro metodu ELISA:

V metodě ELISA byla použita řada roztoků, konkrétně se jednalo o:

Antigen: lidský CD40 antigen (Sino Biological)

Sekundární protilátka: Goat anti mouse/Px protilátka (Vector)

Vazebný roztok: 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ v 1 L H₂O, pH 9,6

PBS: 1 l deionizované H₂O, 8 g NaCl, 2,9 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl

Blokovací pufr: 5% PTS (prekolostrální telecí sérum) v PBS

Substrátový roztok: 5 ml fosfocitrátového pufru (51,4 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 24,3 mM C₆H₈O₇ · H₂O, H₂O, pH 5), 2 mg ortho-phenylenediamine (OPD) (Sigma), 2 µl 30% H₂O₂ (Sigma)

Ředicí pufr: 2% PTS v PBS

Promývací roztok T-PBS: 0,05% Tween v PBS

2M H₂SO₄

4.1.7 Reagencie použité pro charakterizaci protilátek

V metodách, kterými byly charakterizovány monoklonální protilátky bylo kromě již zmíněného použito ještě:

Ligand CD40L (Sino Biological) – 100 ng/ml, lidský CD40L

Lipopolysacharid (LPS) – 20 ng/ml

IFN-γ (Sino Biological) – Lidský rekombinantní protein

Trypanová modř

BOFES (Biowest)

4.1.8 Ostatní materiál:

Kultivační destičky s 96 jamkami a plochým dnem (TPP)

Kultivační destičky s 24 jamkami a plochým dnem (TPP)

Mikrotitrační destičky s 96 jamkami a plochým dnem (Costar)

Centrifugační zkumavky (TPP)

Human IL-8 uncoated kit (Invitrogen) – lidský ELISA kit pro detekci IL-8

Human IL-8 ELISA kit (BioLegend) – Lidský ELISA kit pro detekci IL-8

4.2 Metody

4.2.1 Hybridomová technologie

Imunizace

Myš BALB/c byla imunizována čtyřmi dávkami lidského CD40 antigenu, které byly aplikovány intraperitoneálně. Každá dávka obsahovala 50 µg antigenu CD40, který byl obsažen v 200 µL deionizované vody.

První dávka antigenu byla podána spolu s 200 µL kompletního Freudova adjuvans (CFA).

Druhá imunizace proběhla po 14 dnech od aplikace první dávky, kdy bylo s 200 µL antigenu bylo podáno i 200 µL inkompletního Freudova adjuvans (IFA).

Třetí imunizační dávka obsahovala pouze 200 µL rozpuštěného antigenu CD40 a byla podána 14 dní po aplikaci 2. dávky.

Poslední dávka antigenu sloužila jako booster. Byla podána po 14 dnech od aplikace 3. a 3 dny před provedením fúze s myelomovými buňkami. Bylo podáno 200 µL antigenu bez adjuvans.

Odběr sleziny a krve

Myš BALB/c byla uspána v éterové narkóze, vykrvena z ramenního pletence a usmrcena cervikální dislokací. Následně jí byla odebrána slezina, ze které byly získány buňky použité při fúzi. Odebraná krev se nechala vysrážet a byla centrifugována při 460 g po dobu 5 minut při 4°C. Oddělené sérum bylo odseparováno a sloužilo pro kontrolu produkce protilátek pomocí metody ELISA.

Fúze s myelomovými buňkami

Slezina byla po odebrání vložena do kultivačního média bez séra a poté protlačena přes sterilní sítko. Získané splenocyty byly dvakrát promyty pomocí média bez séra (centrifugace při 230 g po dobu pěti minut).

Myelomovým buňkám Sp2 bylo den před uskutečněním fúze vyměněno kultivační médium. To zaručilo, že Sp2 buňky budou v potřebné log fázi růstu. V den fúze byly přeneseny do graduované centrifugační zkumavky a dvakrát promyty médiem bez séra stejně jako splenocyty.

Po promytí byly oba typy buněk smíchány a byla provedena centrifugace při 230 g po dobu sedmi minut v graduované centrifugační zkumavce (50 ml). Veškerý supernatant byl po centrifugaci odstraněn. Zkumavka se směsí buněk byla umístěna do vodní lázně (37–39 °C) a k buňkám byl v průběhu jedné minuty za stálého míchání přidán 1 ml vytemperovaného PEG 1500. Tato směs byla ještě minutu míchána. Následně bylo za stálého míchání po dobu deseti minut přidáno 10 ml vytemperovaného média bez séra. Směs byla centrifugována po dobu 7 minut při 230 g a buňky byly resuspendovány ve 200 ml kultivačního média s HAT. Následně došlo k rozdělení do jamek jedenácti 96–jamkových panelů po 200 μ L. Panely byly inkubovány při 37 °C v 5 % CO₂.

Po 3–4 dnech se v panelech začaly objevovat kolonie hybridomových buněk. Tyto kolonie byly dostatečně velké mezi 10. a 14. dnem po provedení fúze. V tento okamžik byly testovány na produkci protilátek proti CD40 antigenu. Hybridomy z pozitivních jamek byly přeneseny do 24–jamkových panelů.

Klonování hybridomových buněk

Klonování hybridomových buněk bylo provedeno metodou limitního ředění v okamžik, kdy bylo dno jamky 24–jamkového panelu pokryto alespoň z 80 %. Účelem bylo získání monoklonální populace buněk z jednotlivých hybridomů. Byl odebrán vzorek buněk, které byly smíchány 1:1 s trypanovou modří a bylo spočítáno množství buněk/ml v Bürkerově komůrce.

Buňky každého hybridomu byly klonovány do 96–jamkového panelu tak, aby v jedné polovině jamek byla jedna buňka, ve druhé pět buněk ve 200 μ l media na jamku. Pro klonování bylo použito kultivační medium s HT.

Vyklonované buňky byly inkubovány při 37 °C a první drobné shluky množících se buněk bylo možné pozorovat po 4 dnech inkubace. Mezi 7. a 10. dnem bylo možné pozorovat zřetelně viditelné kolonie. Jamky, ve kterých byla jen jedna kolonie byly znovu testovány pomocí metody ELISA na produkci monoklonálních protilátek proti CD40 antigenu. Jamky, kde vyrostlo více kolonií nebyly testovány, protože protilátky v supernatantu nejsou produktem jednoho klonu hybridomové buňky, a proto jsou na testování nevhodné. Tato situace se objevovala hlavně v části panelu, kam bylo aplikováno 5 buněk na jamku.

Mražení produkčních kolonií buněk

Pro případ, že by bylo potřeba v budoucnu zopakovat pokusy, nebo by došlo ke kontaminaci používaných buněk, je potřeba hybridomové buňky i klony zamrazit.

Mražení bylo provedeno, když bylo dosaženo denzity 0,5 – 1 milionu buněk v mililitru média. Buňky byly přeneseny do centrifugační zkumavky a zcentrifugovány při 230 g po dobu pěti minut při 4 °C. Buňky byly resuspendovány v 1,8 ml kultivačního média a bylo přidáno 0,2 ml DMSO. Každý hybridom/klon byl mražen do dvou kryozkumavek. Do každé kryozkumavky bylo aplikováno 1000 µL resuspendovaných buněk. Takto naplněné zkumavky byly uloženy v zmrazovacím zařízení do teploty -80 °C. Zde byly zkumavky s buňkami ponechány 3–4 hodiny a po uplynutí této doby byly přemístěny do tekutého dusíku. Supernatanty získané po provedení centrifugace byly uchovány v -20 °C a byly použity pro další testování připravených monoklonálních protilátek.

4.2.2 ELISA

Na dno mikrotitrační destičky byl navázán CD40 antigen v koncentraci 2 µg/ml vazebného roztoku. Do každé jamky bylo aplikováno 50 µl roztoku antigenu. Takto připravená destička se inkubovala při 4 °C po dobu 24 hodin, nebo minimálně přes noc, ve vlhké komůrce.

Po uplynutí 24–hodinové inkubace byla destička vysušena pomocí poklepu o filtrační papír. Nespecifické vazby byly vyblokovány blokačním pufrům. Do každé jamky bylo přidáno 200 µL blokačního pufru a destička byla inkubována po dobu 45 minut při 37 °C ve vlhké komůrce.

Následně byla destička třikrát pečlivě promyta pomocí promývacího roztoku. Po třetím promytí byla destička ještě vysušena poklepem o filtrační papír. Myší imunní sérum, které bylo použito jako kontrola, bylo naředěno 1:100 a 1:1000 v ředícím roztoku a bylo aplikováno

v objemu 50 μL na jamku destičky. Do zbylých jamek bylo aplikováno 50 μL supernatantu z vytipovaných hybridomových kolonií. Destička byla inkubována při 37°C po dobu 45 minut.

Po uplynutí inkubační doby byla destička 3x promyta a do každé jamky bylo aplikováno 100 μL sekundární protilátky ředěné v ředícím pufru v poměru 1:1000. Destička byla inkubována 30 minut ve 37°C. Po uběhnutí 30 minutové inkubace byla destička 3x promyta.

Enzymatická reakce byla vyvolána pomocí 100 μL substrátového pufru, který byl připraven krátce před použitím. Reakce byla zastavena po 10 minutách pomocí 2M H_2SO_4 a byla měřena absorbance pomocí vertikálního spektrofotometru (BioTek) při vlnové délce 490 nm.

Hybridomové buňky, jejichž protilátky v supernatantu vykazovaly afinitu k CD40 antigenu se pasážovaly do 24-jamkových destiček. Buňky zde byly kultivovány v médiu s HT, které jim bylo měněno dle potřeby tak, aby měly buňky dostatek živin. V době, kdy bylo dno jamky minimálně ze 70–75 % porostlé buňkami, se supernatanty znovu otestovaly na produkci protilátek. Pokud stále produkovaly specifické protilátky, byly klonovány.

4.2.3 Sledování proliferace B lymfocytů

Princip metody:

Principem této metody je sledování počtu B lymfocytů v průběhu času za sníženého množství živin. Pokud dojde ke zvýšené proliferaci buněk, tak tento výsledek ukazuje na agonistickou anti-CD40 MAb, která je schopna zvýšenou proliferaci B lymfocytů vyvolat.

Optimalizace metody:

Pro sledování proliferace B lymfocytů pod vlivem vytvořených monoklonálních protilátek bylo potřeba zajistit, aby se buňky množily, co nejpomaleji. Z toho důvodu bylo potřeba snížit koncentraci séra v kultivačním médiu tak, aby byly buňky schopny přežít, ale aby bylo možné pozorovat rozdíly v růstu. Buňky RAJI byly kultivovány v médiích s koncentracemi séra v rozmezí 10 % – 0,2 %. Byl sledován nárůst buněk v médiích v průběhu času a byla vybrána nejvhodnější koncentrace. Následně byl proveden pokus.

Postup:

RAJI buňky byly kultivovány v médiu obsahujícím sérum. Byl odebrán vzorek, který byl smíchán v poměru 1:1 s trypanovou modří a byla spočítána koncentrace RAJI živých buněk v jednom mililitru média. Z kultivační lahve byl odebrán takový objem média s buňkami, aby bylo možné je aplikovat po 60 tisících buněk na jamku 96-jamkové destičky. Odebrané

médium s buňkami bylo centrifugováno 5 minut při 230 g a 4°C. Supernatant byl odsát a buňky byly resuspendovány v médiu bez séra. Do každé jamky bylo přidáno 180 µL média bez séra s buňkami. Následně bylo do každé jamky aplikováno 20 µL média s protilátkami. Tím byla dosažena 1% koncentrace séra v médiu. Do jamek s negativní kontrolou bylo přidáno médium bez séra (180 µL) a 2 µL séra. Díky tomu bylo dosaženo 1% koncentrace séra v médiu stejně jako u testovaných vzorků. Do jamek s pozitivní kontrolou bylo přidáno 20 µL séra a tím bylo dosaženo 10% koncentrace séra. Každá monoklonální protilátka, stejně jako negativní a pozitivní kontrola byly testovány v triplicaci.

Destička byla inkubována při 37°C v 5% CO₂. Po 24, 48 a 84 hodinách byly odebírány vzorky a byla spočítána koncentrace buněk v jednom ml.

4.2.4 Detekce IL-8 produkovaného monocytu pod vlivem agonistických Anti-CD40 MAbs

Princip metody:

Agonistické anti-CD40 MAbs se vážou na receptor CD40 přítomný na monocytech. Tato interakce vede ke spuštění signalizační kaskády vedoucí k aktivaci monocytů, které produkují IL-8.

Příprava monocytů na detekci IL – 8:

Buňky THP-1 byly spočítány a 3 miliony buněk byly v 10 ml media kultivovány s 5×10^2 U lidského IFN- γ 48 hodin při 37 °C, v 5 % CO₂. (Thomas David et al., 2008).

Po dokončení inkubace byly monocyty jednou promyty kultivačním médiem (5 minut, při 4 °C a 230 g). Do 96-jamkové destičky bylo aplikováno 100 000 buněk/ jamku ve 40 µL média. K buňkám byly přidány supernatanty (80 µL) obsahující MAbs. Objemový poměr buněk a supernatantů s MAbs byl 1:2. Do jamek negativní kontroly bylo místo supernatantů použito 80 µL média. Do pozitivní kontroly bylo přidáno médium a LPS o koncentraci 20 ng/ml, nebo 100 ng/ml CD40L. Takto připravené vzorky byly inkubovány 48 hodin ve 37 °C v přítomnosti 5 % CO₂ (Thomas David et al., 2008).

Detekce IL-8 pomocí metody ELISA:

Pro detekci IL-8 byly použity kity Human IL-8 uncoated kit (Invitrogen) a Human IL-8 ELISA kit (BioLegend). Bylo postupováno podle návodu výrobce.

4.2.5 Detekce inhibice produkce IL-8 monocytu pod vlivem antagonistických anti-CD40 MAbs

Princip metody:

Lidské monocytu na svém povrchu exprimují CD40 receptor, na který se fyziologicky váže ligand CD40L a dochází k produkci IL-8. Pokud dojde k zablokování této interakce pomocí inhibiční (tzn. antagonistické) protilátky, dojde ke snížení produkce IL-8, protože vazebné místo, kam by se mohl napojit ligand, je obsazeno protilátkou.

Příprava monocytů na detekci IL-8

Buňky THP-1 byly naředěny na koncentraci 10^6 buněk/ml. Byl odebrán vzorek monocytů, které byly kultivovány v klasickém kultivačním médiu. Vzorek byl smíchán 1:1 s trypanovou modří a byla zjištěna koncentrace buněk v mililitru média. Následně bylo odebráno takové množství média s buňkami, aby bylo možné do každé jamky 96-jamkové destičky aplikovat 1 000 000 buněk/ml. Buňky byly centrifugovány 5 minut při 4 °C a 230 g a resuspendovány v kultivačním médiu, tak aby v 50 μ L buněčné suspenze, které byly aplikovány do jednotlivých jamek, bylo 200 000 buněk. K resuspendovaným buňkám bylo přidáno 150 μ L supernatantů, které obsahovaly monoklonální protilátky a 100 ng/ml lidského CD40L. Do negativní kontroly nebyl přidán ligand a do pozitivní byl přidán pouze ligand v kultivačním médiu. Všechny vzorky a kontroly byly testovány v triplikaci. Kultivační destička byla inkubována 24 hodin v 37 °C a 5 % CO₂.

4.2.6 Sledování úmrtnosti monocytů pod vlivem antagonistických anti-CD40 MAbs

Monocytu byly kultivovány stejným způsobem jako tomu bylo u přípravy na detekci inhibice produkce IL-8. Po 24-hodinové inkubaci byly z jamek odebrány vzorky, které byly smíchány s trypanovou modří v poměru 1:1 a byly spočítány živé a mrtvé buňky v 1 ml média.

5. Výsledky

5.1 Imunizace a hybridomová fúze

Byla imunizována jedna myš BALB/c, které byly aplikovány čtyři dávky antigenu (vždy po 14 dnech) intraperitoneálně. Čtvrtá dávka sloužila jako stimulační a tři dny po této dávce byla provedena myelomová fúze. Při odběru sleziny byla pozorována splenomegalie a větší množství vaziva, než je obvyklé.

Splenocyty byly fúzovány s myelomovými buňkami a tato suspenze byla aplikována po 200 μ L na jamku do 11 96-jamkových kultivačních destiček. Po 4 dnech se začaly objevovat malé kolonie hybridomových buněk převážně na okrajích jamek. Od 10. dne bylo možné začít testovat supernatanty odebrané od hybridomových kolonií na produkci specifických protilátek proti CD40 antigenu metodou ELISA. Supernatanty byly testovány postupně, jak hybridomové kolonie v jednotlivých jamkách dorůstaly do dostatečné velikosti.

Celkově bylo otestováno 658 jamek z 1058, což činilo 62,3 %. Ve zbytku jamek buď nenarostly žádné kolonie, nebo nebyly schopny dorůst dostatečné velikosti. Pozitivní reakce proti CD40 antigenu byla odhalena u 67 hybridomových kolonií, což tvoří 10,2 %.

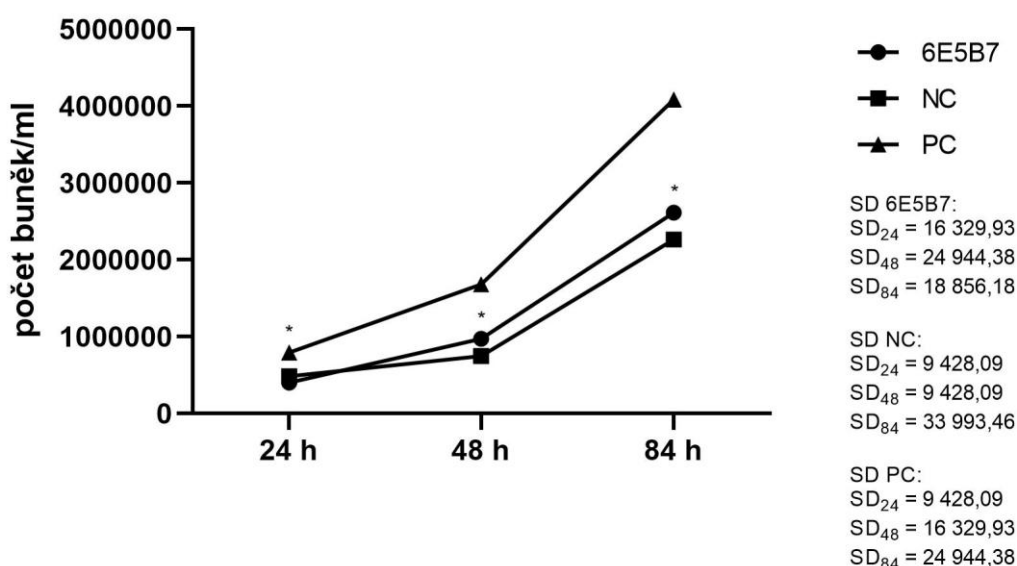
Pozitivně reagující hybridomové kolonie byly dále pasážovány. Když byly kolonie dostatečně narostlé pro případné klonování, byly jejich supernatanty znovu otestovány na produkci specifických protilátek proti CD40 antigenu. Patnáct hybridomových kolonií reagovalo pozitivně. Tyto kolonie byly klonovány a část buněk byla zamražena.

Klonování bylo provedeno do 96-jamkových destiček metodou limitního ředění. Třetí den od klonování se začaly objevovat malé kolonie buněk na okrajích jamek. Od 10. dne byly kolonie dostatečně velké pro testování metodou ELISA. Postupně došlo k otestování veškerých monoklonálních kolonií. Z patnácti vyklonovaných hybridomových kolonií bylo získáno 18 nejvíce produkčních klonů. Od některých hybridomových kolonií nebyly získány žádné klony produkující pozitivně reagující monoklonální protilátky.

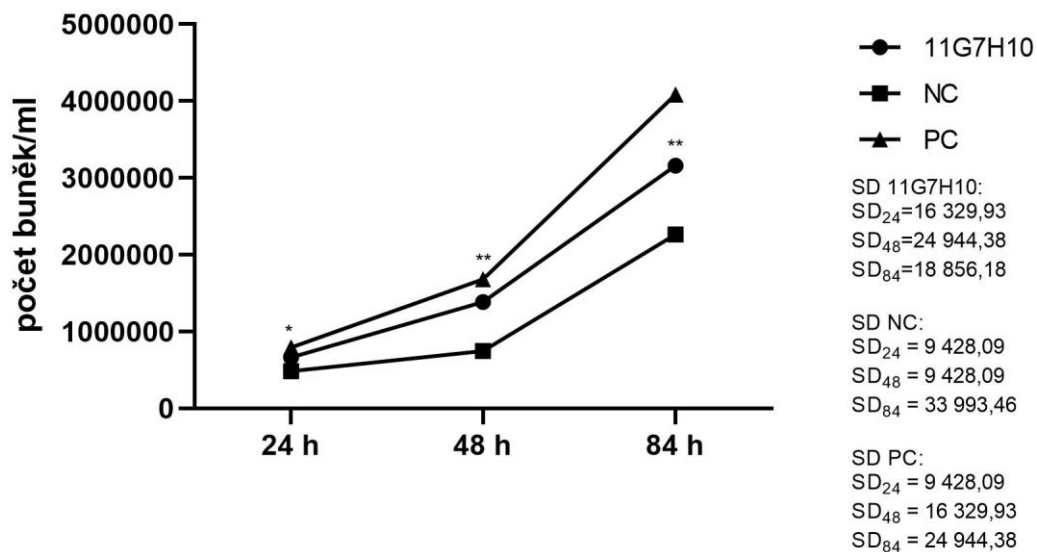
5.2 Proliferace B lymfocytů pod vlivem vytvořených protilátek

Získané monoklonální protilátky v kultivačním mediu z hybridomových kultur byly přidány do bezsérového média s buňkami RAJI (lidská B lymfocytová linie) tak, že výsledná koncentrace séra v kultivačním mediu byla 1 % (protilátky byly v kultivačním mediu ředěny 1:10). Snížení obsahu séra na 1 % bylo provedeno za účelem snížení přirozené proliferace buněk. Byly odebrány vzorky po 24, 48 a 84 hodinách a byly sledovány změny počtu buněk ve srovnání s negativní kontrolou, kterou představovaly buňky RAJI v mediu s 1 % séra bez protilátky. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí testu ANOVA.

U protilátek 11G7H10 a 6E5B7 byl pozorován statisticky významný vzrůst proliferace ve srovnání s negativní kontrolou (Obr. 3 a 4). Tato data ukazují na to, že se může jednat o monoklonální protilátky s agonistickým chováním.

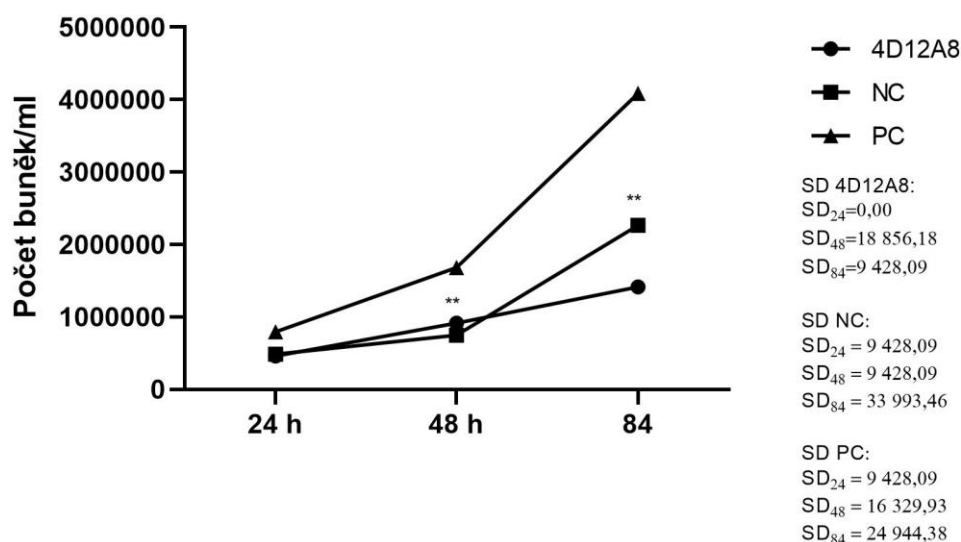


Obr. 3: Proliferace buněk RAJI pod vlivem monoklonální protilátky 6E5B7, která byla sledovaná po 24, 48 a 84 hodinách. Statistická významnost rozdílu ve srovnání s negativní kontrolou (NC) byla po 24 h $p < 0,05$ ($p = 0,012$), po 48 h $p < 0,05$ ($p = 0,005$), po 84 h $p < 0,05$ ($p = 0,002$), uvedené směrodatné odchylky (SD) se vztahují k testovaným vzorkům s protilátkou 6E5B7. V pozitivní kontrole (PC) byly buňky v mediu s 10 % bovinního fetálního séra.

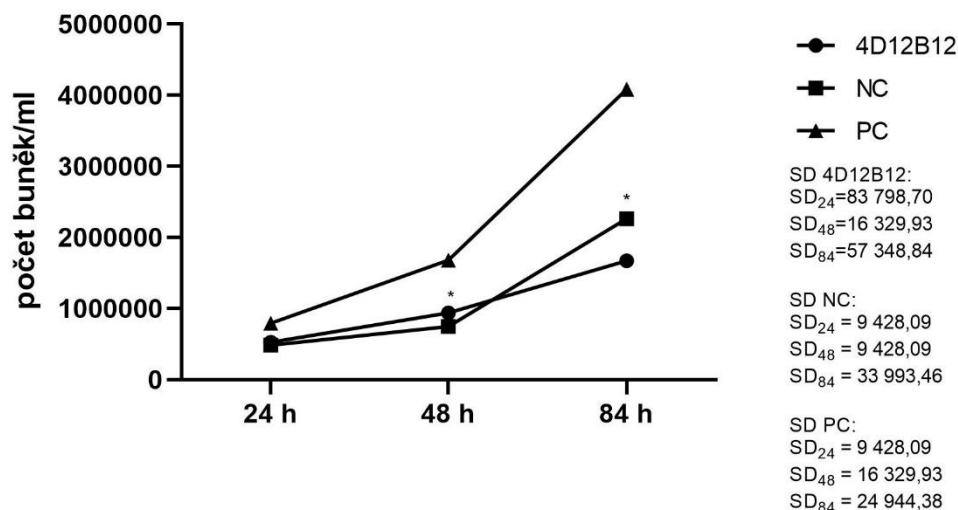


Obr. 4: Proliferace buněk RAJI pod vlivem monoklonální protilátky 11G7H10, která byla sledovaná po 24, 48 a 84 hodinách. Statistická významnost rozdílu ve srovnání s negativní kontrolou (NC) byla po 24 h $p < 0,05$ ($p = 0,025$), po 48 h $p < 0,001$ ($p < 0,0001$), po 84 h $p < 0,001$ ($p < 0,0001$), uvedené směrodatné odchylky (SD) se vztahují k testovaným vzorkům s protilátkou 11G7H10. V pozitivní kontrole (PC) byly buňky v mediu s 10 % bovinního fetálního séra.

U dvou dalších protilátek, konkrétně 4D12A8 a 4D12B12, získaných od jednoho hybridomu 4D12, byl po 84 hodinách pozorován výrazný pokles v proliferaci (Obr. 5 a 6). Kromě toho byla u obou monoklonálních protilátek pozorována aglutinace, která byla nejsilnější po 24 hodinách.



Obr. 5: Proliferace buněk RAJI pod vlivem monoklonální protilátky 4D12A8, která byla sledovaná po 24, 48 a 84 hodinách. Statistická významnost rozdílu ve srovnání s negativní kontrolou (NC) byla po 24 h $p > 0,05$ ($p = 0,1144$), po 48 h $p < 0,05$ ($p = 0,0034$), po 84 h $p < 0,001$ ($p = 0,0007$), uvedené směrodatné odchylky (SD) se vztahují k testovaným vzorkům s protilátkou 4D12A8. V pozitivní kontrole (PC) byly buňky v mediu s 10 % bovinního fetálního séra.



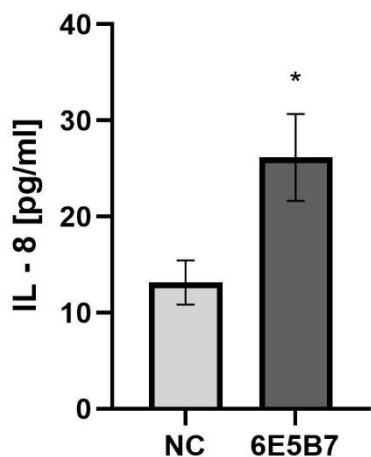
Obr. 6: Proliferace buněk RAJI pod vlivem monoklonální protilátky 4D12B12, která byla sledovaná po 24, 48 a 84 hodinách. Statistická významnost rozdílu ve srovnání s negativní kontrolou (NC) byla po 24 h $p > 0,05$ ($p > 0,999$), po 48 h $p < 0,05$ ($p = 0,001$), po 84 h $p < 0,001$ ($p = 0,001$), uvedené směrodatné odchylky (SD) se vztahují k testovaným vzorkům s protilátkou 4D12B12. V pozitivní kontrole (PC) byly buňky v mediu s 10 % bovinního fetálního séra.

Zbylé monoklonální protilátky nezpůsobovaly statisticky významné zvýšení nebo snížení proliferace buněk RAJI a z toho důvodu byly z následujícího testování vyřazeny.

5.3 Stanovení produkce IL-8 monocyty

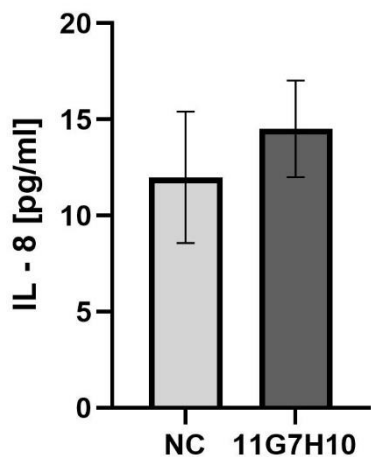
Buňky lidské monocytové linie THP-1 byly inkubovány 2 dny s IFN- γ a poté 2 dny v přítomnosti získaných monoklonálních protilátek. IL-8 byl stanoven z odebraných supernatantů pomocí metody ELISA. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí T-testu.

Protilátka 6E5B7 vykazovala stejně jako v předchozím testu pozitivní reakci (Obr. 7). Získaná produkce IL-8 pod vlivem aktivace monocytů touto protilátkou byla více než dvojnásobná ve srovnání s negativní kontrolou. Z tohoto vyplývá, že se pravděpodobně jedná o agonistickou protilátku, která je schopná aktivovat B lymfocyty i monocyty.



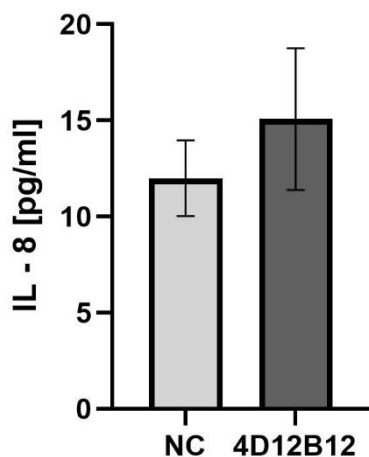
Obr. 7: Produkce IL-8 buňkami THP-1 pod vlivem monoklonální protilátky 6E5B7. Negativní kontrola (NC) jsou buňky THP-1 preinkubované s IFN- γ bez protilátky. Statistická významnost byla $p < 0,05$ ($p = 0,0113$).

Protilátka 11G7H10 nezvyšovala statisticky významně produkci IL-8 buňkami THP-1 (Obr. 8).

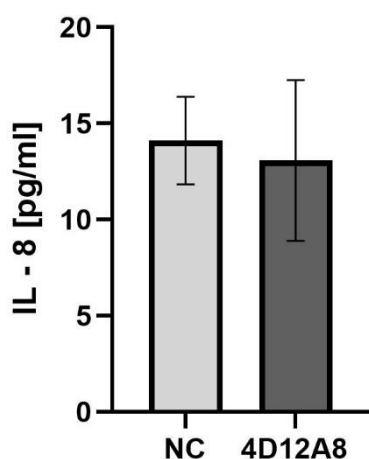


Obr. 8: Produkce IL-8 buňkami THP-1 pod vlivem monoklonální protilátky 11G7H10. Negativní kontrola (NC) jsou buňky THP-1 preinkubované s IFN- γ bez protilátky. Statistická významnost byla $p > 0,05$ ($p = 0,3621$).

Protilátka 4D12B12 nevyvolávala statisticky významné zvýšení produkce IL-8 buňkami THP-1 (Obr. 9) a protilátka 4D12A8 dokonce dokázala snížit produkci IL-8 buňkami ve srovnání s negativní kontrolou (Obr. 10).



Obr. 9: Produkce IL-8 buňkami THP-1 pod vlivem monoklonální protilátky 4D12B12. Negativní kontrola (NC) jsou buňky THP-1 preinkubované s IFN- γ bez protilátky. Statistická významnost byla $p > 0,05$ ($p = 0,5017$).



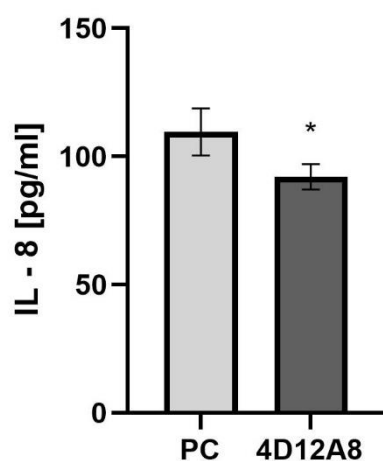
Obr. 10: Produkce IL-8 buňkami THP-1 pod vlivem monoklonální protilátky 4D12A8. Negativní kontrola (NC) jsou buňky THP-1 preinkubované s IFN- γ bez protilátky. Statistická významnost byla $p > 0,05$ ($p = 0,788$).

5.4 Inhibice produkce IL–8 antagonistickými protilátkami

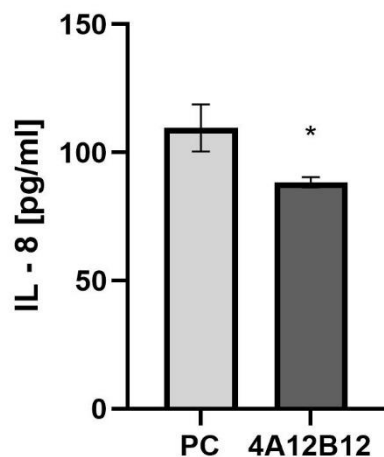
Pro testování inhibice byly vybrány dvě protilátky – 4D12A8 a 4D12B12, které vykazovaly inhibici proliferace buněk RAJI a nezpůsobovaly zvýšenou produkci IL–8 monocyty.

Buňky THP–1 byly během tohoto testu inkubovány s ligandem CD40L a s vybranými monoklonálními protilátkami. V tomto testu byly testovány potenciální antagonistické protilátky, které jsou schopny zablockovat vazbu ligandu na receptor a snížit tak produkci IL–8 monocyty.

Obě vybrané monoklonální protilátky byly schopny inhibovat vazbu ligandu CD40L na receptor CD40, který je přítomen na monocyttech (Obr. 11 a 12). Výsledek byl porovnáván s pozitivní kontrolou, která obsahovala pouze ligand CD40L, pomocí T–testu.



Obr. 11: Inhibice produkce IL–8 buňkami THP–1 v důsledku zablockování receptoru CD40 pomocí protilátky 4D12A8. Pozitivní kontrola obsahovala pouze ligand CD40L. Statistická významnost byla $p < 0,05$ ($p = 0,044$).

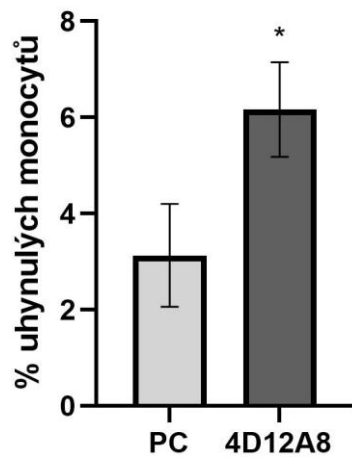


Obr. 12: Inhibice produkce IL-8 buňkami THP-1 v důsledku zablokování receptoru CD40 pomocí protilátky 4D12B12. Statistická významnost byla $p < 0,05$ ($p = 0,0174$).

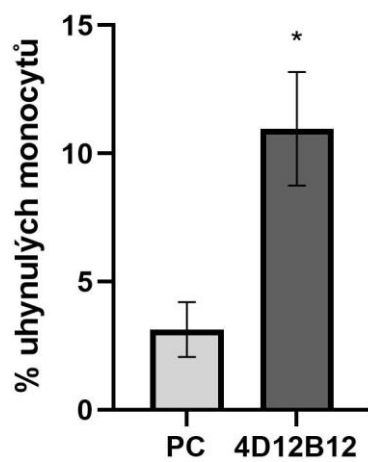
5.5 Hynutí monocytů pod vlivem antagonistických protilátek

Krom inhibice produkce IL-8 byl u protilátek 4D12A8 a 4D12B12 sledován vliv na hynutí buněk THP-1, které byly připraveny a kultivovány s CD40L stejným způsobem, jako v předchozím pokusu. Bylo sledováno procento uhynulých buněk pod vlivem protilátek a porovnáno s pozitivní kontrolou. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí T-testu.

Obě testované protilátky vykazovaly statisticky významné výsledky ve srovnání s pozitivní kontrolou. Pod vlivem protilátky 4D12B12 byla pozorována vyšší úmrtnost než u protilátky 4D12A8 (Obr. 13 a 14).



Obr. 13: Hynutí buněk THP-1 pod vlivem protilátky 4D12A8 v přítomnosti CD40L. Statistická významnost byla $p < 0,05$ ($p = 0,023$).



Obr. 14: Hynutí buněk THP-1 pod vlivem protilátky 4D12B12 v přítomnosti CD40L. Statistická významnost byla $p < 0,05$ ($p = 0,005$).

6. Diskuse

Monoklonální protilátky jsou v nynější době používány pro diagnostické a léčebné postupy. Mnoho laboratorních metod využívá monoklonální protilátky pro detekci patogenů, ale také pro zviditelnění imunochemických reakcí, mezi něž lze zařadit např. metodu EIA, nebo ELISA. Co se léčebných postupů týká, monoklonální protilátky zaznamenávají uplatnění v léčbě onkologických onemocnění jako tzv. biologická léčba (např. rituximab) (Zambruno & Borradori, 2008), ale v posledních letech byly využity i pro léčbu infekcí Covid-19 (Shanmugaraj et al., 2020).

Monoklonální protilátky se dají připravit pomocí hybridomové technologie, jejíž princip je velice dobře popsán a zavedený. Monoklonální protilátky získané od jednoho klonu jsou namířeny proti jednomu epitopu antigenu a pokud je kolonie dobře uchována, získáme tím neomezené množství protilátek, které buňky produkují do média. S takto vyprodukovanými protilátkami lze dále pracovat.

Nejprve bylo potřeba otestovat, zda vytvořené MAbs reagují na CD40 antigen. K tomu byla použita metoda ELISA. Tato metoda je poměrně robustní, v jednom testu je možno otestovat mnoho vzorků, také je snadno interpretovatelná a poměrně levná. Jejím problémem je časová náročnost a nutná pečlivost v provedení velkého množství kroků, ale také fakt, že klony produkující velké množství protilátek o nízké afinitě mohou reagovat pozitivněji než vysoce afinní protilátky o nízké koncentraci (Lad et al., 2015). V našem případě výhody metody značně převyšují její úskalí a volbu metody pro primární testování lze považovat za vhodnou. Prvním krokem byla optimalizace metody ELISA, při které bylo zjištěno, že 2 $\mu\text{g/ml}$ antigenu poskytují stejně uspokojivé výsledky jako 10 $\mu\text{g/ml}$ antigenu, a proto byla použita nižší koncentrace. Pozitivně reagující kolonie byly pomnoženy a znovu otestovány po několika dnech. To bylo provedeno z důvodu ustálení počtu chromozomů v hybridomových buňkách, kdy po fúzi dochází k postupnému ztracení chromozomů a mohlo by dojít k zastavení produkce protilátek. Po druhém otestování bylo získáno 8 hybridomových kolonií, které pozitivně reagovaly na CD40 antigen. Následným klonováním bylo získáno 18 produkčních klonů, což lze považovat za velice uspokojivý výsledek. Monoklonální protilátky získané od těchto klonů byly následně charakterizovány pomocí několika metod.

Prvním provedeným testem pro charakterizaci získaných monoklonálních protilátek bylo sledování proliferace B lymfocytů pod jejich vlivem. Agonistické anti-CD40 jsou schopny vyvolat proliferaci B lymfocytů. Nejprve bylo potřeba zjistit, při jakém množství séra v médiu dojde ke snížení proliferace B lymfocytární linie RAJI, tak, aby bylo možné pozorovat rozdíly

způsobené protilátkami. Toto množství bylo určeno na 1 %. Nevýhodu této metody spatřujeme v tom, že použité monoklonální protilátky byly v médiu odebraném z klonů, kde nebylo známo, jak moc jsou živiny spotřebované. Z tohoto důvodu je pravděpodobné, že množství séra v médiu bylo nižší než 1 %. To by mohlo zkreslovat výsledky a falešně snížit proliferaci B lymfocytů u protilátek, které by se jinak chovaly agonisticky.

Dvě protilátky, konkrétně 6E5B7 a 11G7H10, zvyšovaly proliferaci B lymfocytů ve srovnání s negativní kontrolou. To ukazovalo na to, že by se mohlo jednat o agonistické protilátky, protože tyto výsledky korelovaly s výsledky výzkumů Chen et al. (2010). Qi et al. (2004) ve své studii uvádí, že nízká koncentrace agonistických protilátek způsobuje proliferaci, a naopak vysoká koncentrace má za následek aglutinaci B lymfocytů, inhibici proliferace a jejich apoptózu. Aglutinace a inhibice proliferace po 84 hodinách byla pozorována u dvou protilátek – 4D12A8 a 4D12B12. Tento výsledek by mohl ukazovat na to, že se jedná o agonistické protilátky o vysoké koncentraci, nebo antagonistické protilátky, které jsou podle Marken et al. (2021) schopny inhibovat proliferaci B lymfocytů, nebo na vyčerpání média. Z tohoto důvodu byly tyto čtyři protilátky dále testovány.

Agonistické protilátky aktivují monocyty a tím dochází k produkci IL–8 ve zvýšeném množství (Thomas David et al., 2008). Z tohoto důvodu byla provedena cytokinová ELISA, při které bylo sledováno množství vyprodukovaného IL–8 buněčnou linií THP–1. Pod vlivem monoklonální protilátky 6E5B7 byla produkce IL–8 zvýšena a byl detekován statisticky významný rozdíl ve srovnání s negativní kontrolou. Tento výsledek potvrdil výsledek získaný při sledování proliferace a je možné, že se jedná o agonistickou anti–CD40 protilátku.

Pod vlivem 11G7H10 nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v koncentraci IL–8 ve srovnání s negativní kontrolou. To by mohlo znamenat, že se o agonistickou protilátku nejedná, nebo by mohla být v médiu tak malá koncentrace protilátky, že nebyla schopna vyvolat dostatečnou produkci IL–8 monocyty. Pokud by v médiu byla opravdu jen nízká koncentrace monoklonální protilátky, koreloval by tento výsledek s vysokou proliferací B lymfocytů, jak uvádí Qi et al. (2004) ve své studii.

Protilátky 4D12A8 a 4D12B12 nevyvolávaly zvýšenou produkci IL–8. Díky tomu bylo ověřeno, že se s největší pravděpodobností nejedná o agonistické protilátky, ale mohlo by se jednat o antagonistické protilátky. Z tohoto důvodu byly tyto dvě protilátky otestovány ještě na schopnost inhibovat interakci CD40 receptoru na monocytech s ligandem CD40L, který byl přidán k THP–1 buněčné linii spolu s protilátkami. Po 24–hodinové inkubaci byla stanovena produkce IL–8 pomocí metody ELISA. V přítomnosti obou protilátek došlo ke snížení koncentrace IL–8 ve srovnání s pozitivní kontrolou, která obsahovala pouze ligand

CD40L. To ukazuje na to, že došlo k vazbě protilátek na receptory CD40 na monocytech. Ligand se nemohl navázat a vyvolat tím aktivaci monocytů a následně produkci IL–8. Z tohoto výsledku vyplývá, že se s velkou pravděpodobností jedná o antagonistické monoklonální protilátky proti lidskému CD40 antigenu. Tento pokus poskytl podobné výsledky jako studie Luqman et al. (2008), kde byla testována antagonistická protilátka a její vliv na produkci IL–8 periferními krevními mononukleárními buňkami, které zahrnují i monocyty.

Posledním testem bylo sledování úhynu monocytů v přítomnosti 4D12A8 a 4D12B12. Monocyty byly inkubovány s ligandem CD40L i s protilátkou, stejně jako v předchozím pokusu. Byl pozorován statisticky významný úhyn těchto buněk pod vlivem protilátek v porovnání s buňkami inkubovanými jen s ligandem CD40L. Podobný experiment, který by pracoval s monocyty, bohužel nebyl publikován a z tohoto důvodu není s čím tento výsledek srovnat. Pravděpodobně se v našem případě jednalo o apoptózu vyvolanou použitými protilátkami, které jsou nejspíše antagonistického charakteru. Apoptózu by ale v budoucnu bylo potřeba potvrdit pomocí průtokové cytometrie, kde by došlo k detekci znaků spojených s apoptózou.

Získané výsledky ukazují na to, že se nám pravděpodobně podařilo připravit jednu agonistickou protilátku, dvě antagonistické a jednu protilátku, která by také mohla být agonistická, ale je důležité, aby byla otestována dalšími metodami. Postupem, kterým by se vytvořené protilátky daly ještě charakterizovat, je určení izotypu protilátek, což je velmi diskutovaný problém vzhledem k otázce důležitosti Fc receptorů. Některé studie tvrdí, že je nutné, aby byla agonistická protilátka napojena přes tento receptor, jinak není schopna chovat se agonisticky a vyvolat protinádorovou reakci (Dahan et al., 2016). U lidských buněk by se mělo jednat konkrétně o inhibiční receptor FcγRIIB, který je přítomný například na B lymfocytech (Smith & Clatworthy, 2010). Naopak některé agonistické protilátky, včetně lidské anti–CD40 protilátky Selicrelumab (CP-870,893) přítomné v klinickém testování, jsou IgG2 izotypu, o kterém je známo, že se na Fc receptory špatně váže a velice pravděpodobně je v tomto případě podstatná antigenní specifita monoklonální protilátky (Khalil & Vonderheide, 2007).

Další metodou, kterou je možno detekovat agonistické anti-CD40 protilátky je průtoková cytometrie. Pod jejich vlivem se zvyšuje exprese CD80 a CD86 u dendritických buněk (van Mierlo et al., 2004) a CD95 znak na B lymfocytech (Wang et al., 1997). Dalšími možnostmi by mohla být detekce produkce IL–12 u dendritických buněk (Thomas et al., 2008).

Vzhledem k tomu, že byla pro imunizaci použita myš, jsou vytvořené protilátky myšího původu a pro použití v lidské medicíně je potřeba je humanizovat. Princip humanizace spočívá

v tom, že dojde k ponechání CDR (complementarity-determining region) oblastí a zbylé části protilátky jsou vyměněny za lidské. Díky tomu dojde k výraznému snížení imunogenicity protilátek (Ahmadzadeh et al., 2014).

Humanizované agonistické protilátky je poté možno použít v nádorové imunoterapii, která může být podána sama o sobě, nebo může být kombinovaná s jinými možnostmi léčby, jako je operační vyloučení nádorové tkáně, nebo chemoterapie (Vonderheide, 2020). Humanizované antagonistické protilátky mohou být využity v léčbě autoimunitních onemocnění (Toubi & Shoenfeld, 2004), nebo během transplantací, jako prevence odhojení štěpu (Haanstra et al., 2003).

7. Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala tvorbou agonistické myší monoklonální protilátky proti CD40 antigenu. Hybridomová technologie, pomocí které byly monoklonální protilátky vytvořené, proběhla úspěšně. Získané protilátky byly charakterizovány pomocí vlivu na buněčnou linii B lymfocytů a monocytů. Na základě toho byla identifikována jedna protilátka, která svými vlastnostmi odpovídala agonistické protilátce. Dále byla identifikována protilátka, která v jednom z testů reagovala jako agonistická, nicméně v druhém pokusu nebyl dosažen pozitivní výsledek. Kromě agonistických protilátek byly identifikovány dvě monoklonální protilátky, které vykazovaly antagonistické reakce.

8. Seznam zkratek

APC	antigen prezentující buňka
BOFES	bovinní fetální sérum
CD	cluster of differentiation
CTL	cytotoxický T lymfocyt
DC	dendritická buňka
DMSO	dimethyl sulfoxid
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů
HAT	hypoxantin, aminopterin, thymidin
HT	hypoxantin, thymidin
ICAM-1	intercelulární adhezivní molekula 1
IFN	interferon
IL	interleukin
JAK	Janus kináza
kb	kilobáze
kDa	kilodaltony
LPS	lipopolysacharid
MAb	monoklonální protilátka
MBL	mannan vázající lektin
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MMP	matrixová metaloproteináza
NO	oxid dusnatý
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PD-L1	programmed cell death ligand

PTS	prekolostrální telecí sérum
sCD40L	solubilní CD40L
STAT	přenašeč signálů, transkripční faktor
TGF	transformující růstový faktor
Tlr	toll – like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TYK2	tyrosin kináza
VCAM–1	vaskulární buněčná adhezní molekula 1

9. Reference

- Ahmadzadeh, V., Farajnia, S., Feizi, M. A. H., & Nejad, R. A. K. (2014). Antibody humanization methods for development of therapeutic applications. In *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 33(2), 67–73.
- Ahonen, C. L., Gibson, S. J., Smith, R. M., Pederson, L. K., Lindh, J. M., Tomai, M. A., & Vasilakos, J. P. (1999). Dendritic Cell Maturation and Subsequent Enhanced T-Cell Stimulation Induced with the Novel Synthetic Immune Response Modifier R-848. *Cellular Immunology*, 197, 62–72.
- Alderson, M. R., Armitage, R. J., Tough, T. W., Strockbine, L., Fanslow, W. C., & Spriggs, M. K. (1993). CD40 Expression by Human Monocytes: Regulation by Cytokines and Activation of Monocytes by the Ligand for CD40. *Journal of Experimental Medicine*, 178, 669–674.
- Aoyagi, T., Yamashita, K., Suzuki, T., Uno, M., Goto, R., Taniguchi, M., Shimamura, T., Takahashi, N., Miura, T., Okimura, K., Itoh, T., Shimizu, A., Furukawa, H., & Todo, S. (2009). A human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys: Induction and maintenance therapy. *American Journal of Transplantation*, 9(8), 1732–1741.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briè, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F., & Saeland, S. (1994). The CD40 Antigen and its Ligand. *Annual Review of Immunology*, 12(1), 881–926.
- Banchereau Jacques, de Paoli Paolo, Vallé Alain, Garcia Eric, & Rousset Françoise. (1991). Long-Term Human B Cell Lines Dependent on Interleukin-4 and Antibody to CD40. *Science*, 251, 70–71.
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *The Lancet*, 380(9853), 1590–1605.
- Beatty, G. L., Chiorean, E. G., Fishman, M. P., Saboury, B., Teitelbaum, U. R., Sun, W., Huhn, R. D., Song, W., Li, D., Sharp, L. L., Torigan, D. A., O'Dwyer, P. J., & Vonderheide, R. H. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*, 331(6024), 1612–1616.
- Bergstrom, R. T., Silverman, D. A., Chambers, K., & Kim, J. A. (2004). CD40 monoclonal antibody activation of antigen-presenting cells improves therapeutic efficacy of tumor-specific T cells. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 130(1), 94–103.
- Boon, L., Brok, H. P. M., Bauer, J., Ortiz-Buijsse, A., Schellekens, M. M., Ramdien-Murli, S., Blezer, E., van Meurs, M., Ceuppens, J., de Boer, M., 't Hart, B. A., & Laman, J. D. (2001). Prevention of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Using a Chimeric Antagonist Monoclonal Antibody Against Human CD40 Is Associated with Altered B Cell Responses . *The Journal of Immunology*, 167(5), 2942–2949.
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., & Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF

- receptor family members in the mouse and human. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13964–13971.
- Brines, R. D., & Klaus, G. G. B. (1993). Polyclonal activation of immature B cells by preactivated T cells: the role of IL-4 and CD40 ligand. *International Immunology*, 5(11), 1445–1450.
- Buhmann Raymund, Nolte Annette, Westhaus Doreen, Emmerich Bertold, & Hallek Michael. (1999). CD40-Activated B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells for Tumor Immunotherapy: Stimulation of Allogeneic Versus Autologous T Cells Generates Different Types of Effector Cells. *Blood*, 93, 1992–2002.
- Caisova, V., Li, L., Gupta, G., Jochmanova, I., Jha, A., Uher, O., Huynh, T. T., Miettinen, M., Pang, Y., Abunimer, L., Niu, G., Chen, X., Ghayee, H. K., Taïeb, D., Zhuang, Z., Zenka, J., & Pacak, K. (2019). The significant reduction or complete eradication of subcutaneous and metastatic lesions in a pheochromocytoma mouse model after immunotherapy using mannan-BAM, TLR ligands, and anti-CD40. *Cancers*, 11(5).
- Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., Krejčová, G., Paďouková, L., Jochmanová, I., Wolf, K. I., Chmelař, J., Kopecký, J., & Ženka, J. (2016). Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*, 16(1).
- Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Kärre, K., & Zappacosta, S. (1997). A New Mechanism of NK Cell Cytotoxicity Activation: The CD40-CD40 Ligand Interaction. *Journal of Experimental Medicine*, 185, 2053–2060.
- Carpenter, E. L., Mick, R., Rüter, J., & Vonderheide, R. H. (2009). Activation of human B cells by the agonist CD40 antibody CP-870,893 and augmentation with simultaneous toll-like receptor 9 stimulation. *Journal of Translational Medicine*, 7 (93)
- Celia, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., & Alber, G. (1996). Brief Definitive Report Ligation of CD40 on Dendritic Cells Triggers Production of High Levels of Interleukin-12 and Enhances T Cell Stimulatory Capacity: T-T Help via APC Activation. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 747–752.
- Cerutti, A., Schaffer, A. S., Shah, S., Zan, H., Liou, H.-C., Goodwin, R. G., & Casali, P. (1998). CD30 Is a CD40-Inducible Molecule that Negatively Regulates CD40-Mediated Immunoglobulin Class Switching in Non-Antigen-Selected Human B Cells. *Immunity*, 9, 247–256.
- Charafeddine, A. H., Kim, E. J., Maynard, D. M., Yi, H., Weaver, T. A., Gunay-Aygun, M., Russell, M., Gahl, W. A., & Kirk, A. D. (2012). Platelet-derived CD154: Ultrastructural localization and clinical correlation in organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 12(11), 3143–3151.
- Chen, C. H., Abi-Ghanem, D., Njongmeta, L., Bray, J., Mwangi, W., Waghela, S. D., McReynolds, J. L., Ing, N. H., & Berghman, L. R. (2010). Production and characterization of agonistic monoclonal antibodies against chicken CD40. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(11), 1139–1143.

- Conley, M. E., Larche, M., Bonagura, V. R., Lawton, A. R., Buckley, R. H., Fu, S. M., Coustan-Smith, E., Herrod, H. G., & Campana, D. (1994). Hyper IgM Syndrome Associated with Defective CD40-mediated B Cell Activation. *J. Clin. Invest*, *94*, 1404–1409.
- Cooke, P. W., James, N. D., Ganesan, R., Wallance, M., Burton, A., Lawrence, Y. S. (1999). CD40 EXPRESSION IN BLADDER CANCER. *J. Pathol*, *188*, 38–43.
- Cordoba, F., Wieczorek, G., Audet, M., Roth, L., Schneider, M. A., Kunkler, A., Stuber, N., Erard, M., Ceci, M., Baumgartner, R., Apolloni, R., Cattini, A., Robert, G., Ristig, D., Munz, J., Haeberli, L., Grau, R., Sickert, D., Heusser, C., ... Rush, J. S. (2015). A novel, blocking, Fc-silent anti-CD40 monoclonal antibody prolongs nonhuman primate renal allograft survival in the absence of B cell depletion. *American Journal of Transplantation*, *15*(11), 2825–2836.
- Croft, M., Gramaglia, I., Weinberg, A. D., & Lemon, M. (1998). Molecule for Sustaining Primary CD4 T Cell Ox-40 Ligand. *The Journal of Immunology*, *161*, 6510–6517.
- Dahan, R., Barnhart, B. C., Li, F., Yamniuk, A. P., Korman, A. J., & Ravetch, J. v. (2016). Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective FcγR Engagement. *Cancer Cell*, *29*(6), 820–831.
- Danese, S., Sans, M., Scaldaferrri, F., Sgambato, A., Rutella, S., Cittadini, A., Piqué, J. M., Panes, J., Katz, J. A., Gasbarrini, A., & Fiocchi, C. (2006). TNF-Blockade Down-Regulates the CD40/CD40L Pathway in the Mucosal Microcirculation: A Novel Anti-Inflammatory Mechanism of Infliximab in Crohn's Disease 1. *The Journal of Immunology*, *176*, 2617–2624.
- Díaz, Á., González-Alayón, I., Pérez-Torrado, V., & Suárez-Martins, M. (2021). CD40-CD154: A perspective from type 2 immunity. *Seminars in Immunology*, *53*, 1–10.
- Draing, C., Pfitzenmaier, M., Zummo, S., Mancuso, G., Geyer, A., Hartung, T., & von Aulock, S. (2006). Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(45), 33849–33859.
- El-Shabrawi, Y., Livir-Rallatos, C., Christen, W., Baltatzis, S., & Foster, C. S. (1998). High Levels of Interleukin-12 in the Aqueous Humor and Vitreous of Patients with Uveitis. *Ophthalmology*, *105*, 1659–1663.
- Fernandez-Cabezudo, M. J., Ullah, A., Flavell, R. A., & Al-Ramadi, B. K. (2005). Evidence for the requirement for CD40-CD154 interactions in resistance to infections with attenuated *Salmonella*. *Journal of Endotoxin Research*, *11*(6), 395–399.
- Foy, T. M., Laman, J. D., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E., & Noeue, R. J. (1994). gp39-CD40 Interactions Are Essential for Germinal Center Formation and the Development of B Cell Memory. *Journal of Experimental Medicine*, *180*, 157–163.
- Foy, T. M., Shepherd, D. M., Durie, F. H., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., & Noelle, R. J. (1993). In Vivo CD40-gp39 Interactions Are Essential for Thymus-dependent Humoral Immunity. H. Prolonged Suppression of the Humoral Immune Response by an Antibody to the Ligand for CD40, gp39. *Journal of Experimental Medicine*, *178*, 1567–1575.

- Gallagher, N. J., Eliopoulos, A. G., Agathangelo, A., Oates, J., Crocker, J., & Young, L. S. (2002). CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*, 55(2), 110–120.
- Gauchat, J.-F., Aubry, J.-P., Mazzei, C., Life, P., Jomotte, T., E&on, G., & Bonnefoy, J.-Y. (1993). *Human CD40 ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production*. 315(3).
- Gauchat, J.-F., Henchoz, S., Fattah, D., Mazzei, G., Aubry, J.-P., Jomotte, T., Dash, L., Page, K., Solari, R., Aldebert, D., Capron, M., Dahinden, C., & Bonnefoy, J.-Y. (1995). CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur. J. Immunol*, 25, 863–865.
- Grewa Iqbal S., Foellmer Harald G., Grewa Kate D., Xu Jianchao, Hardardottir Fridrika, Baron Jody L., Janeway Jr. Charles A., & Flavel Richard A. (1996). Requirement for CD40 Ligand in Costimulation Induction, T Cell Activation, and Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Science*, 273, 1864–1867.
- Groscurth, P., & Filgueira, L. (1998). Killing Mechanisms of Cytotoxic T Lymphocytes. *Int. Union Physiol. Sci./Am. Physiol. Soc. News Physiol. Sci.*, 13, 17–21.
- Haanstra, K. G., Ringers, J., Sick, E. A., Ramdien-Murli, S., Kuhn, E. M., Boon, L., & Jonker, M. (2003). Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation*, 75(5), 637–643.
- Hattori, Y., Kasai, K., Akimoto, K., & Thiemermann, C. (1997). Induction of NO Synthesis by Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus* in J774 Macrophages: Involvement of a CD14-Dependent Pathway. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 233, 375–379.
- Henn Volker, Slupsky Joseph R., Gräfe Michael, Anagnostopoulos Ioannis, Förster Reinhold, Müller-Berghaus Gert, & Kroczeck Richard A. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391, 591–594.
- Hess Andreas Altenburg, S., Baldus, S. E., & Smola, H. (1999). γ Synergism with IFN- γ Chemokines in Cervical Carcinoma Cells in CD40 Ligand-CD40 Interaction Induces.
- Ho, W. Y., Cooke, M. P., Goodnow, C. C., & Davis, M. M. (1994). Resting and Anergic B Cells Are Defective in CD28-dependent Costimulation of Naive CD4 + T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 179, 1539–1549.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., & Hartmann, G. (2002). Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1–10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 168(9), 4531–4537.
- Jackaman, C., & Nelson, D. J. (2012). Intratumoral interleukin-2/agonist CD40 antibody drives CD4 + -independent resolution of treated-tumors and CD4 + -dependent systemic and memory responses. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(4), 549–560.
- Jacobson, E. M., Concepcion, E., Oashi, T., & Tomer, Y. (2005). A graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene

- translation: A case for translational pathophysiology. *Endocrinology*, 146(6), 2684–2691.
- Janeway, C. A., & Bottomly, K. (1994). Signals and Signs for Lymphocyte Responses. *Cell*, 76, 275–285.
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 197–216.
- Jenkins, S. J., Perona-Wright, G., Worsley, A. G. F., Ishii, N., & MacDonald, A. S. (2007). Dendritic Cell Expression of OX40 Ligand Acts as a Costimulatory, Not Polarizing, Signal for Optimal Th2 Priming and Memory Induction In Vivo. *The Journal of Immunology*, 179(6), 3515–3523.
- Kamanaka, M., Yu, P., Yasui, T., Yoshida, K., Kawabe, T., Horii, T., Kishimoto, T., & Kikutani, H. (1996). Protective Role of CD40 in *Leishmania major* Infection at Two Distinct Phases of Cell-Mediated Immunity CD40-CD40L interaction also plays a critical role in cell-mediated immune responses. Experimental infection with the intracellular proto-zoon, *Leishmania major*, is an excellent model to study. *Immunity*, 4, 275–281.
- Kasran, A., Boon, L., Wortel, C. H., van Hogezaand, R. A., Schreiber, S., Goldin, E., de Boer, M., Geboes, K., Rutgeerts, P., & Ceuppens, J. L. (2005). Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22(2), 111–122.
- Katz, F., Hinshelwood, S., Rutland, P., Jones, A., Kinnon, C., & Morgan, G. (1996). Mutation analysis in CD40 ligand deficiency leading to X-linked hypogammaglobulinemia with hyper IgM syndrome. *Human Mutation*, 8(3), 223–228.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., & Kikutani, H. (1994). The Immune Responses in CD40-Deficient Mice: Impaired Immunoglobulin Class Switching and Germinal Center Formation. *Immunity*, 1, 167–178.
- Kawamura Nobuko, Imanishi Noriaki, Koike Haruhiko, Nakahara Hajime, Phillips Laurine, & Morooka Shigeaki. (1995). LIPOTEICHOIC ACID-INDUCED NEUTROPHIL ADHESION VIA E-SELECTIN TO HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS (HUVECs). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217, 1208–1215.
- Keir, M. E., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2007). PD-1 Regulates Self-Reactive CD8 + T Cell Responses to Antigen in Lymph Nodes and Tissues . *The Journal of Immunology*, 179(8), 5064–5070.
- Khalil, M., & Vonderheide, R. H. (2007). Anti-CD40 agonist antibodies: Preclinical and clinical experience. In *Update on Cancer Therapeutics*, 2(2), 61–65.
- Khong, A., Nelson, D. J., Nowak, A. K., Lake, R. A., & Robinson, B. W. S. (2012). The use of agonistic anti-CD40 therapy in treatments for cancer. *International Reviews of Immunology*, 31(4), 246–266.

- Kim, D. Y., Hong, G. U., & Ro, J. Y. (2011). Signal pathways in astrocytes activated by cross-talk between of astrocytes and mast cells through CD40-CD40L. *Journal of Neuroinflammation*, *8*, 1–16.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kimpfen, E., Romani, N., & Schuler, G. (1996). Brief Definitive Report High Level IL-12 Production by Murine Dendritic Cells: Upregulation via MHC Class II and CD40 Molecules and Downregulation by IL-4 and IL-10. *Journal of Experimental Medicine*, *184*(2).
- Kochupurakkal, B. S., Wang, Z. C., Hua, T., Culhane, A. C., Rodig, S. J., Rajkovic-Molek, K., Lazaro, J. B., Richardson, A. L., Biswas, D. K., & Iglehart, J. D. (2015). RelA-induced interferon response negatively regulates proliferation. *PLOS ONE*, *10*(10), 1–33.
- Lad, L., Clancy, S., Kovalenko, M., Liu, C., Hui, T., Smith, V., & Pagramis, N. (2015). High-throughput kinetic screening of hybridomas to identify high-affinity antibodies using bio-layer interferometry. *Journal of Biomolecular Screening*, *20*(4), 498–507.
- Liu Zhanju, Colpaert Stefaan, Haens Geert R., Kasran Ahmad, Boer Mark de, Rurgeerts Paul, Geboes Karel, & Ceuppens Jan L. (1999). Hyperexpression of CD40 Ligand (CD154) in Inflammatory Bowel Disease and Its Contribution to Pathogenic Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, *163*(7), 4049–4057.
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF Receptor Review Superfamilies: Integrating Mammalian Biology The receptors and ligands in this superfamily have unique structural attributes that couple them directly to signaling pathways for cell proliferation, survival, and differentiation. Thus, they have assumed prominent roles in the generation of tissues and transient microen. *Cell*, *104*, 487–501.
- Luheshi, N. M., Coates-Ulrichsen, J., Harper, J., Mullins, S., Sulikowski, M. G., Martin, P., Brown, L., Lewis, A., Davies, G., Morrow, M., & Wilkinson, R. W. (2016). Transformation of the tumour microenvironment by a CD40 agonist antibody correlates with improved responses to PD-L1 blockade in a mouse orthotopic pancreatic tumour model. *Oncotarget*, *7*(14).
- Luqman, M., Klabunde, S., Lin, K., Georgakis, G. v., Cherukuri, A., Holash, J., Goldbeck, C., Xu, X., Kadel, E. E., Lee, S. H., Aukerman, S. L., Jallal, B., Aziz, N., Weng, W. K., Wierda, W., O'Brien, S., & Younes, A. (2008a). The antileukemia activity of a human anti-CD40 antagonist antibody, HCD122, on human chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, *112*(3), 711–720
- MacDonald, A. S., Straw, A. D., Dalton, N. M., & Pearce, E. J. (2002). Cutting Edge: Th2 Response Induction by Dendritic Cells: A Role for CD40. *The Journal of Immunology*, *168*(2), 537–540.
- Marken, J., Muralidharan, S., & Giltiy, N. v. (2021). Anti-CD40 antibody KPL-404 inhibits T cell-mediated activation of B cells from healthy donors and autoimmune patients. *Arthritis Research and Therapy*, *23*(1), 1–15.
- Marzo, A. L., Kinnear, B. F., Lake, R. A., Frelinger, J. J., Collins, E. J., Robinson, B. W. S., & Scott, B. (2000). Tumor-Specific CD4 T Cells Have a Major “Post-Licensing” Role in CTL Mediated Anti-Tumor Immunity 1. *The Journal of Immunology*, *165*, 6047–6055.

- Mcwhirter, S. M., Pullen, S. S., Holton, J. M., Crute, J. J., Kehry, M. R., & Alber, T. (1999). Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2 Purification of Human TRAF2 and CD40-p1. *Biochemistry*, *96*, 8408–8413.
- Medina, R., Wang, H., Caisová, V., Cui, J., Indig, I. H., Uher, O., Ye, J., Nwankwo, A., Sanchez, V., Wu, T., Nduom, E., Heiss, J., Gilbert, M. R., Terabe, M., Ho, W., Zenka, J., Pacak, K., & Zhuang, Z. (2020). Induction of Immune Response against Metastatic Tumors via Vaccination of Mannan-BAM, TLR Ligands, and Anti-CD40 Antibody (MBTA). *Advanced Therapeutics*, *3*(9), 1–29.
- Mingari M. C., Gerosa F., Carra G., Accolla R. S., Moretta A., Zubler R. H., Waldmann T. A., & Moretta L. (1984). Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature*, *312*, 641–643.
- Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Lishomwa, ‡, Ndhlovu, C., Nose, M., Noda, T., & Sugamura, K. (2000). Impairment of Antigen-presenting Cell Function in Mice Lacking Expression of OX40 Ligand. *J. Exp. Med*, *191*(2), 365–374.
- Nangaku, M., & Couser, W. G. (2005). Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. In *Clinical and Experimental Nephrology* (Vol. 9, Issue 3, pp. 183–191).
- Noelle, R. J., Ledbetter, J. A., & Aruffo, A. (1992). CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunology Today*, *13*, 431–433.
- Nurden, A. T. (2011). Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, *105*(SUPPL. 1), 13–33.
- Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Ulcerative colitis. *The Lancet*, *380*(9853), 1606–1619.
- Ortega, L. M., Schultz, D. R., Lenz, O., Pardo, V., & Contreras, G. N. (2010). Lupus nephritis: Pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. In *Lupus*, *19*(5), 557–574
- Paul, S., & Lal, G. (2017). The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1–15.
- Paul, W. E., & Ohara, lunichi. (1987). B-CELL STIMULATORY. *Ann. Rev.Lmmunol*, *5*, 429–459.
- Perper, S. J., Westmoreland, S. v., Karman, J., Twomey, R., Seagal, J., Wang, R., McRae, B. L., & Clarke, S. H. (2019). Treatment with a CD40 Antagonist Antibody Reverses Severe Proteinuria and Loss of Saliva Production and Restores Glomerular Morphology in Murine Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, *203*(1), 58–75.
- Peters, A. L., Stunz, L. L., & Bishop, G. A. (2009). CD40 and autoimmunity: The dark side of a great activator. In *Seminars in Immunology*, *21*(5), 293–300.
- Pinchuk, L. M., Klaus, S. J., Magaletti, D. M., Pinchuk, G. v, Norsen, J. P., & Clark, E. A. (1996). Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *The Journal of Immunology*, *157*(10), 4363.

- Presanis, J. S., Kojima, M., & Sim, R. B. (2003). Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochemical Society Transaction*, 31, 748–752.
- Qi, C. J., Zheng, L., Zhou, X., Tao, Y., Ge, Y., Zhuang, Y. M., Xu, Y., Yu, G. H., & Zhang, X. G. (2004). Cross-linking of CD40 using anti-CD40 antibody, 5C11, has different effects on XG2 multiple myeloma cells. *Immunology Letters*, 93(2–3), 151–158.
- Ramesh, N., Ramesh, V., Gusella, J. F., & Geha, R. (1993). Chromosomal Localization of the Gene for Human B-Cell Antigen CD40. *Cell and Molecular Genetics*, 1(3), 295–298.
- Saeland, S., Duvert, V., Moreau, I., & Banchereau, J. (1993). Human B Cell Precursors Proliferate and Express CD23 after CD40 Ligation. *Journal of Experimental Medicine*, 178, 113–120.
- Sahoo, N. C., Rao, K. V. S., & Natarajan, K. (2002). CD80 Expression is Induced on Activated B Cells Following Stimulation by CD86. *Scandinavian Journal of Immunology*, 55, 577–584.
- Schoenberger Stephen P., Toes Rene E. M., van der Voort Ellen I. H., Offringa Rienk, & Melief Cornelis J. M. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature*, 393, 480–483.
- Schönbeck, U., & Libby, P. (2001). The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. In *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, 58.
- Schünbeck, U., Mach, F., Sukhova, G. K., Herman, M., Graber, P., Kehry, M. R., & Libby, P. (2000). CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *American Journal of Pathology*, 156(1), 7–14.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17406–17409.
- Shanmugaraj, B., Siriwananon, K., Wangkanont, K., & Phoolcharoen, W. (2020). Perspectives on monoclonal antibody therapy as potential therapeutic intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19). In *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 38 (1), 10–18
- Siegmund, R., Vogelsang, H., Machnik, A., & Herrmann, D. (2000). Surface membrane antigen alteration on blood basophils in patients with Hymenoptera venom allergy under immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(6), 1190–1195.
- Smith, K. G. C., & Clatworthy, M. R. (2010). FcγRIIB in autoimmunity and infection: Evolutionary and therapeutic implications. In *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 328–343.
- Sospedra, M., & Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. In *Annual Review of Immunology*, 23, 683–747).
- Thomas David, de Boer Mark, Res Pieter C.J.M., & Simons Petrus Johannes. (2008). *CD40-binding APC-activating molecules*.

- Toubi, E., & Shoenfeld, Y. (2004). The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity*, 37(6/7), 457–464.
- Tousoulis, D., Androulakis, E., Papageorgiou, N., Briasoulis, A., Siasos, G., Antoniadis, C., & Stefanadis, C. (2010). From Atherosclerosis to Acute Coronary Syndromes: The Role of Soluble CD40 Ligand. In *Trends in Cardiovascular Medicine*, 20 (5), 153–164.
- Turner, J. G., Rakhmilevich, A. L., Burdelya, L., Neal, Z., Imboden, M., Sondel, P. M., & Yu, H. (2001). Anti-CD40 Antibody Induces Antitumor and Antimetastatic Effects: The Role of NK Cells. *The Journal of Immunology*, 166(1), 89–94.
- Uher, O., Caisova, V., Padoukova, L., Kvardova, K., Masakova, K., Lencova, R., Frejlichova, A., Skalickova, M., Venhauerova, A., Chlastakova, A., Hansen, P., Chmelar, J., Kopecky, J., Zhuang, Z., Pacak, K., & Zenka, J. (2021a). Mannan-BAM, TLR ligands, and anti-CD40 immunotherapy in established murine pancreatic adenocarcinoma: understanding therapeutic potentials and limitations. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70(11), 3303–3312.
- Uher, O., Huynh, T. T., Zhu, B., Horn, L. A., Caisova, V., Hadrava Vanova, K., Medina, R., Wang, H., Palena, C., Chmelar, J., Zhuang, Z., Zenka, J., & Pacak, K. (2021b). Identification of immune cell infiltration in murine pheochromocytoma during combined mannan-bam, tlr ligand, and anti-cd40 antibody-based immunotherapy. *Cancers*, 13, 1–15.
- Ussell, R., & Oss, R. (1999). *ATHEROSCLEROSIS-AN INFLAMMATORY DISEASE*, 340.
- van Kooten, G., & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. In *Journal of Leukocyte Biology*, 67(1), 2–17.
- van Mierlo, G. J. D., Boonman, Z. F. H. M., Dumortier, H. M. H., den Boer, A. Th., Fransen, M. F., Nouta, J., van der Voort, E. I. H., Offringa, R., Toes, R. E. M., & Melief, C. J. M. (2004). Activation of Dendritic Cells That Cross-Present Tumor-Derived Antigen Licenses CD8 + CTL to Cause Tumor Eradication . *The Journal of Immunology*, 173(11), 6753–6759.
- Visvanathan, S., Daniluk, S., Ptaszyński, R., Müller-Ladner, U., Ramanujam, M., Rosenstock, B., Eleftheraki, A. G., Vinisko, R., Petříková, A., Kellner, H., Dokoupilova, E., Kwiatkowska, B., Alten, R., Schwabe, C., Baum, P., Joseph, D., Fine, J. S., Padula, S. J., & Steffgen, J. (2019). Effects of BI 655064, an antagonistic anti-CD40 antibody, on clinical and biomarker variables in patients with active rheumatoid arthritis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase IIa study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(6), 754–760.
- Vonderheide, R. H. (2020). *Annual Review of Medicine CD40 Agonist Antibodies in Cancer Immunotherapy*.
- Wagner, T. L., Ahonen, C. L., Couture, A. M., Gibson, S. J., Miller, R. L., Smith, R. M., Reiter, M. J., Vasilakos, J. P., & Tomai, M. A. (1999). *Modulation of TH1 and TH2 Cytokine Production with the Immune Response Modifiers, R-848 and Imiquimod*, 191, 10–19

- Walker, J. A., & McKenzie, A. N. J. (2018). TH2 cell development and function. In *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 121–133
- Wang, D., Freeman, G. J., Levine, H., Ritz, J., & Robertson, M. J. (1997). Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *British Journal of Haematology*, 97, 409–417.
- Young', L. S., Dawson', C. W., Brow', K. W., & Rickinson', A. B. (1989). IDENTIFICATION OF A HUMAN EPITHELIAL CELL SURFACE PROTEIN SHARING OF B LYMPHOCYTES AN EPITOPE WITH THE C3dIEPSTEIN-BARR VIRUS RECEPTOR MOLECULE. In *Int. J. Cancer*, 43, 786–794
- Zambruno, G., & Borradori, L. (2008). Rituximab immunotherapy in pemphigus: Therapeutic effects beyond B-cell depletion. In *Journal of Investigative Dermatology*, 128(12), 2745–2747
- Zan, H., Schaffer, A., & Casali, P. (1998). CD40 Engagement Triggers Switching to IgA1 and IgA2 in Human B Cells Through Induction of Endogenous TGF- β : Evidence for TGF- β But Not IL-10-Dependent Direct Sm3Sa and Sequential Sm3Sg, Sg3Sa DNA Recombination, *The Journal of Immunology*, 161, 5217–5225
- Zhou, Z. X., Zhang, B. C., & Sun, L. (2014). Poly(I:C) induces antiviral immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) that require TLR3 and MDA5 and is negatively regulated by Myd88. *PLoS ONE*, 9(11).