

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

Olgerd BABKIN
Molekulinė biotechnologija

Bakalauro baigiamasis darbas
**KLAMPIOS TERPĖS HIBRIDOMŲ KLONAVIMUI IR ATRANKAI
OPTIMIZAVIMAS**

Darbo vadovas
Dr. Martynas Simanavičius

Vilnius, 2024

KLAMPIOS TERPĖS HIBRIDOMŲ KLONAVIMUI IR ATRANKAI OPTIMIZAVIMAS

Bakalauro darbas rengtas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto
Imunologijos skyriuje

Olgerd Babkin



/parašas/

Darbo vadovas:

Dr. Martynas Simanavičius



/parašas/

2024-05-27

TURINYS

Santrumpos	5
ĮVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1 Hibridomų technologija.....	9
1.1.1 Ląstelių hibridizacija	10
1.1.2 HAT atrankos sistema	10
1.1.3 Imunofermentinė analizė	11
1.2 Antikūnai.....	12
1.2.1 Monokloninių antikūnų taikymai	13
1.2.1.1 MAk taikymai diagnostikoje	13
1.2.1.2 MAk taikymai vėžinių ligų terapijoje	14
1.3 Žinduolių ląstelių klonavimas.....	15
1.3.1 Žinduolių ląstelių klonavimo būdai.....	16
1.3.2 Serijinis skiedimas.....	16
1.3.3 Ląstelių klonavimas klampioje terpėje ir robotizuota ląstelių klonų atrankos sistema	18
1.4 Metilceliuliozė	19
1.4.1 Metilceliuliozės cheminės savybės	19
1.4.2 Celiuliozės darinių taikymai	20
1.4.2.1 Metilceliuliozės ir jos darinių taikymai maisto pramonėje	20
1.4.2.2 Metilceliuliozės ir jos darinių taikymai farmacijoje ir biomedicinoje	21
1.4.2.3 Metilceliuliozės ir jos darinių taikymai ląstelių auginimui	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	23
2.1 Medžiagos.....	23
2.1.1 Ląstelių linijos	23
2.1.2 Reagentai.....	23
2.1.3 Antikūnai, antigenai, kiti baltymai ir rinkiniai.....	23
2.1.4 Ląstelių augimo terpės ir priedai	23
2.1.5 Tirpalai.....	24
2.2 Įranga, prietaisai ir priemonės	24
2.3 Metodai.....	25
2.3.1 Ląstelių atšildymas, auginimas ir kriokonservavimas	25

2.3.2 Ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumo vertinimas.....	26
2.3.3 Darbas su laboratoriniais gyvūnais.....	26
2.3.4 Mielomos ląstelių auginimas	27
2.3.5 Mielomos ir blužnies ląstelių suliejimas, išsėjimas ir auginimas selektyvioje terpėje.....	27
2.3.6 Klampios terpės gamyba.....	28
2.3.7 Metilceliuliozės koncentracijos klampioje terpėje ir ląstelių sėjimo koncentracijos optimizavimas.	29
2.3.8 Hibridomų klonų stebėjimas ir izoliavimas robotizuota klonų atrankos sistema Clonepix 2 .	30
2.3.9 Netiesioginė imunofermentinė analizė (ELISA).....	31
2.3.10 Antikūnų klasių ir poklasių nustatymas.....	31
2.3.11 Statistinė duomenų analizė.....	32
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
3.1 Metilceliuliozės koncentracijos klampioje terpėje optimizavimas	33
3.1.1 Hibridomų augimas skirtingos MC koncentracijos terpėse	34
3.1.2 Užaugusių hibridomų klonų kokybės analizė	35
3.2 Optimalios hibridomų koncentracijos sėjimui klampioje terpėje nustatymas	37
3.2.1 Hibridomų augimas klampioje terpėje sėjant skirtingas ląstelių koncentracijas	38
3.2.2 Užaugusių hibridomų klonų kokybės analizė	39
3.2.2.1 Užaugusių hibridomų klonų kategorijų palyginimas	39
3.2.2.2 Užaugusių hibridomų klonų dydžių palyginimas	42
3.3 Ląstelių auginimas hibridomoms selektyvioje klampioje terpėje	43
3.3.1 Ląstelių hibridizacija ir išsėjimas	43
3.3.2 Užaugusių klonų izoliavimas, testavimas ir reklonavimas	43
IŠVADOS	46
SANTRAUKA.....	47
SUMMARY	48
PADĖKA	49
LITERATŪROS ŠALTINIAI	50
PRIEDAI	55

Santrumpos

ADCC – nuo antikūnų priklausomas citotoksiškumas (angl. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*);

B-ALL – ūmi B ląstelių limfoblastinė leukemija (angl. *B-cell acute lymphoblastic leukemia*);

BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*);

CDC – nuo komplemento baltymų priklausomas citotoksiškumas (angl. *complement dependent cytotoxicity*);

CLL – lėtinė limfocitų leukemija (angl. *chronic lymphocytic leukemia*);

CMC – karboksimetilceliuliozė;

EGFR – epiderminis augimo faktoriaus receptorių (angl. *epidermal growth factor receptor*);

ELISA – imunofermentinė analizė (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*);

FVS – fetalinis veršiuko serumas;

HAT – hipoksantinas, aminopterinas, timidinas;

hCG – žmogaus chorioninis gonadotropinas (angl. *human chorionic gonadotropin*);

hESC – žmogaus embrioninė kamieninė ląstelė (angl. *human embryonic stem cell*);

HGPRT – hipoksantino-guanino fosforiboziltransferazė;

HPMC – hidroksipropilmetilceliuliozė;

HT – hipoksantinas, timidinas;

ICC – imunocitochemija;

Ig – imunoglobulinas;

IHC – imunohistochemija;

LDC – klonavimas serijiniu skiedimu (angl. *limited dilution cloning*);

MAk – monokloniniai antikūnai;

MAC – membranos puolimo kompleksas (angl. *Membrane Attack Complex*);

MC – metilceliuliozė;

NHL – Ne Hodžkino limfoma (angl. *non-Hodgkin's lymphoma*);

OT – optinis tankis;

PAk – polikloniniai antikūnai;

PEG – polietilenglikolis;

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas.

IVADAS

Hibridomų technologija – tai plačiai naudojamas metodas skirtas sukurti monokloninius antikūnus (MAk) prieš tikslius antigenus. Hibridomų technologija gaminami MAk yra taikomi autoimuninių, infekcinių ar vėžinių ligų diagnostikoje, diagnostinių testų kūrimo bei įvairaus pobūdžio moksliniuose ir diagnostiniuose tyrimuose. Antikūnai yra sparčiai auganti biofarmacinių preparatų klasė, kurios rinka 2023 metais perkopė 230 mlrd. JAV dolerių ribą (Antibody Market Outlook..., 2024). Hibridomos – tai hibridinės ląstelės pasižyminčios didelių monokloninių antikūnų kiekių gamyba. Jos yra gaunamos suliejant antikūnus gaminančias plazmines ląsteles su vėžinėmis mielomos ląstelėmis. Tokiu būdu sulietos ląstelės įgauna savybę greitai proliferuoti ir tuo pačiu sekretuoti didelius kiekius specifinių antikūnų bei būna imortalizuojamos.

Daugiausiai darbo ir laiko resursų reikalaujantis etapas hibridomų gamyboje yra jų atranka ir monokloninės populiacijos izoliavimas. Tradicinis hibridomų klonavimo metodas yra serijinis skiedimas (*LDC*, angl. *limited dilution cloning*). *LDC* tikslas – atrinktų populiacijų ląsteles skiesti iki labai mažo tankio (≈ 1 ląstelė šulinėlyje) ir auginti 96 šulinėlių plokštelėse siekiant gauti monokloninę populiaciją, pasižyminčią efektyvia specifinio baltymo gamyba. Šis metodas yra sąlyginai paprastas ir pigus, tačiau reikalauja daug personalo darbo laiko ir pakartojimų bei negarantuoja, kad izoliuota ląstelių populiacija bus monokloniška. Ląstelių auginimas klampioje terpėje (angl. *semi-solid media*) ir susidariusių klonų izoliavimas rankiniu būdu ar robotizuotomis sistemomis yra dar vienas monokloninių ląstelių populiacijų atrankos būdas. Klampioje terpėje augančios ląstelės yra imobilizuojamos ir atskiriamos viena nuo kitos, todėl yra užkertamas kelias ląstelių maišymuisi ir padidėja monokloninės populiacijos susidarymo ir sėkmingo izoliavimo tikimybė. Be to, naudojant klampią terpę, ląstelių gaminami produktai (antikūnai ar kiti baltymai) išlieka šalia klonų ir nepasklinda, kaip tai vyksta skystoje terpėje. Naudojant fluorescuojančią žymę pažymėtus antikūnus prieš sekretuojamą baltymą, antikūnus prieš sekretuojamus imunoglobulinus ar antigeną su fluorescuojančią žymę galima identifikuoti aukšto produktyvumo klonus be papildomų tyrimų ir tik juos selektyviai izoliuoti.

Robotizuotos ląstelių klonų atrankos sistemos, tokios kaip Clonepix 2 iš *Molecular Devices*, padeda greitai ir tiksliai izoliuoti klonus, užaugusius klampioje terpėje. Ši sistema pagal nurodytus kriterijus vizualizuoja, atranka ir perkelia klonus iš vienos plokštelės į kitą. Klonai transportuojami steriliomis adatėlėmis ir izoliuojami nuo kitų klonų, taip jie yra apsaugomi nuo susimaišymo su kitomis ląstelėmis. Dėl šios priežasties, klonai, susidarę iš vienos ląstelės, išlieka monoklonais po jų

izoliavimo ir tolesnio auginimo metu. Naudojant robotizuotą sistemą padidėja tikimybė izoliuoti produktyvias ląstelių linijas, sutaupoma daug darbo ir laiko resursų.

Klampus terpes ląstelių auginimui gamina kelios biotechnologijų įmonės, tokios kaip *ThermoFisher Scientific*, *Stemcell Technologies*, *Corning*, *Lonza* ir *Molecular Devices*, tačiau tik *Stemcell Technologies*, *Lonza* ir *Molecular Devices* klampios terpės yra pritaikytos hibridomų klonavimui. Šių terpių gamybai yra naudojamas polimeras metilceliuliozė (*Stemcell Technologies*, *Molecular Devices*) ir agarozė (*Lonza*). Šiame darbe tikimasi pasiūlyti ekonomiškai patrauklų klampios terpės gamybos protokolą mažais kiekiais. Klampios terpės panaudojimas ląstelių klonavimui užtikrins aukštesnę žinduolių kultūrose gaminamų produktų kokybę dėl ląstelių linijų monokloniškumo. Tai užtikrintų mažesnes verslo įmonių sąnaudas paruošiant iš mokslo perimtus produktus rinkai, o mokslininkams leistų sutaupyti darbo laiko ir finansinių resursų reagentams.

Šiame darbe kaip klampios terpės pagrindas naudojama metilceliuliozė (MC). MC yra ląstelėms netoksiškas polimeras, suteikiantis terpei klampumo, kurio dėka hibridomos imobilizuojamos ir atskiriamos nuo kitų ląstelių. MC polimerizuojasi ir sutvirtėja 37 °C temperatūroje, kurioje ir auginamos ląstelės, o kambario temperatūroje išlieka skysta. MC tarnauja kaip fizinis barjeras tarp ląstelių, todėl hibridomos linkusios formuoti monoklonines populiacijas, kurias patogiau izoliuoti robotizuota ląstelių klonų atrankos sistema.

Darbo tikslas

Sukurti ir optimizuoti klampios terpės gamybos protokolą hibridomų klonavimui ir atrankai.

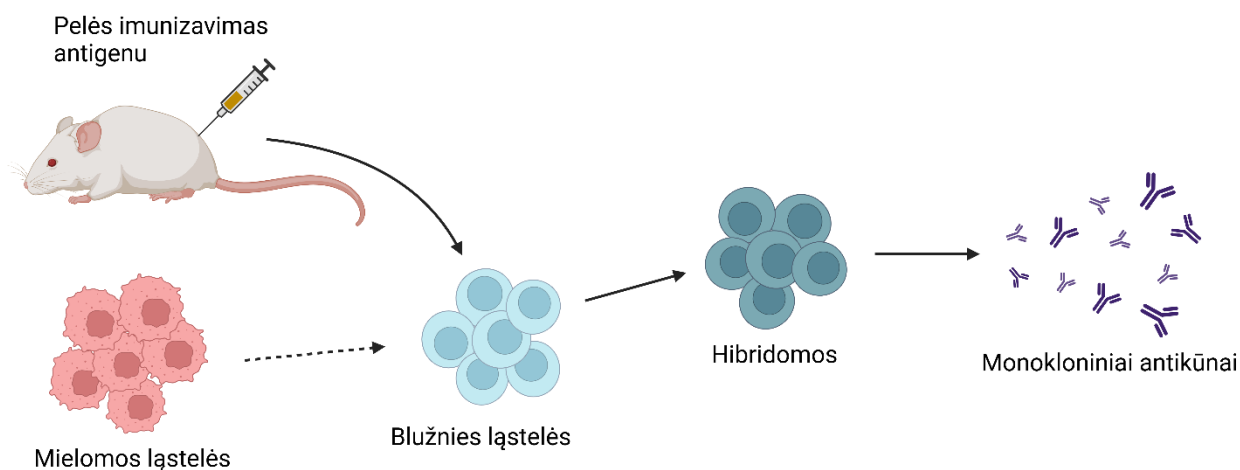
Darbo uždaviniai

1. Nustatyti hibridomų augimui ir klonų formavimuisi optimalią metilceliuliozės koncentraciją klampioje terpėje.
2. Nustatyti hibridomų augimui ir klonų formavimuisi optimalią ląstelių sėjimo koncentraciją į klampią terpę.
3. Taikant hibridomų technologiją atlikti ląstelių hibridizaciją ir ląstelių mišinį išsėti į optimizuotą selektyvią klampią terpę.
4. Clonepix 2 sistema izoliuoti klampioje terpėje užaugusius hibridomų klonus ir identifikuoti klonus, gaminančius antikūnus prieš tikslinį antigeną.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Hibridomų technologija

Hibridomos – tai hibridinės ląstelės pasižyminčios didelių monokloninių antikūnų kiekių gamyba (Köhler and Milstein, 1975). Jos yra gaunamos suliejant imunizuoto gyvūno (dažniausiai pelės (lot. *Mus musculus*)) blužnies ląsteles su mielomos ląstelėmis (**1 pav.**) (Köhler and Milstein, 1975). Tokiu būdu sulietos ląstelės įgauna savybę greitai proliferuoti ir tuo pačiu sekretuoti didelius kiekius specifinių antikūnų bei būna imortalizuojamos (Köhler and Milstein, 1975). Taip pat, hibridomos gali būti ilgam laikui užšaldomos ir laikomos skystame azote (Mitra and Tomar, 2021). Stabilizuota hibridomų linija – tai patikimas ir atsinaujinantis monokloninių antikūnų šaltinis, kas lemia hibridomų platų pritaikymą įvairaus pobūdžio moksliniuose ir diagnostiniuose tyrimuose bei terapijoje.



1 pav. Hibridomų technologijos schema. Sukurta naudojant *BioRender.com*

Hibridomų technologija – tai plačiai naudojamas metodas skirtas sukurti monokloninius antikūnus prieš tikslinius antigenus (**1 pav.**). Šios technologijos dėka buvo sukurta daug skirtingų monokloninių antikūnų prieš specifinius antigenus, tokius kaip fermentai, hormonai, vidiniai ir išoriniai bakterijų, virusų, eukariotinių ląstelių elementai (baltymai, lipidai, angliavandeniai ar nukleorūgštys) (Mitra and Tomar, 2021). Šiuo metodu sukurti monokloniniai antikūnai yra aukšto specifiškumo, kadangi juos gamina iš vienos ląstelės susidariusi populiacija – monoklonas (Shulman et al., 1978).

1.1.1 Ląstelių hibridizacija

Hibridomų gamybos procesas prasideda nuo imunizacijos, kai laboratoriniam gyvūnui (pelei ar žiurkei) suleidžiama specifinio antigeno injekcija (Ganguly & Wakchaure, 2016). Vykstant injekcijų serijai stimuliuojama B ląstelių diferenciacija į plazmines B ląsteles ir atminties B ląsteles (Ganguly & Wakchaure, 2016). Imunizacijos laikotarpiu pelės blužnyje susidaro aktyvuotos plazminės ląstelės gaminančios specifinius antikūnus prieš tikslinį antigeną (Ganguly & Wakchaure, 2016).

Prieš kelias savaites iki hibridizacijos metastazavusios vėžinės ląstelės yra auginamos 8-azaguanine, kuris užblokuoja funkcinį HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) geną mielomos ląstelėse (Choi and Chung, 1999). Šių genų slopinimas lemia mielomos ląstelių jautrumą HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine), kuris yra pagrindinis hibridomų atrankos sistemos faktorius (Choi and Chung, 1999). Prieš savaitę iki hibridizacijos mielomos ląstelės yra atšildomos ir kultivuojamos 75 cm² flakonuose. Paaukojus imunizuotą pelę, steriliai išimama ir susmulkinama blužnis, kurioje susikaupusios aktyvuotos plazminės ląstelės. Blužnies ląstelės suspenduojamos augimo terpėje bei izoliuojamos centrifuguojant.

Ląstelių hibridizacijos metu izoliuotos blužnies ląstelės yra suliejamos su HAT jautriomis mielomos ląstelėmis (Yelton et al., 1979). Suliejime dalyvauja polietilenglikolis (PEG), kuris atpalaiduoja blužnies ir mielomos ląstelių plazmines membranas bei skatina jų susiliejimą (Mitra and Tomar, 2021).

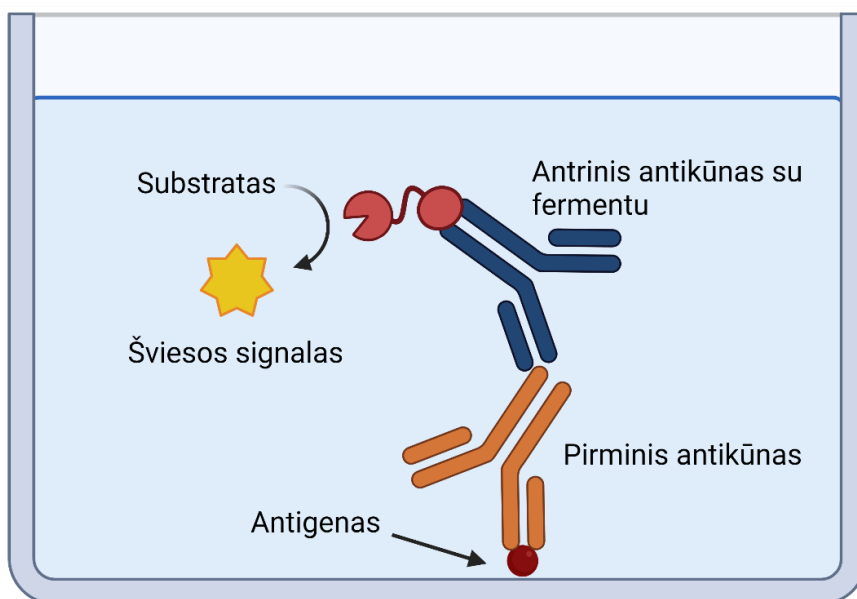
1.1.2 HAT atrankos sistema

PEG suliejimas yra bene dažniausiai naudojamas ląstelių suliejimo būdas hibridomų gamyboje, tačiau proceso eigoje tik 1-2 % ląstelių hibridizuojasi ir suformuoja hibridomas. Be to, tarp visų hibridizuotų ląstelių vos 1 % išliks gyvybingos ir gebės proliferuoti. Didžiąją dalį į terpę išsėtų ląstelių sudaro nesulietos ląstelės (Köhler and Milstein, 1975), todėl siekiant izoliuoti hibridomas yra vykdoma atranka HAT terpėje. Po hibridizacijos, ląstelės yra išsėjamos į 96 šulilnėlių plokšteles ir auginamos 10-14 dienų HAT atrankos terpėje (Hnasko and Stanker, 2015). Nesulietų plazminių ląstelių gyvavimo trukmė yra kelios dienos (Hnasko and Stanker, 2015), todėl jų pašalinimas nereikalauja papildomų medžiagų terpėje. Tuo tarpu nesulietas mielomos ląsteles būtina pašalinti, kadangi labai greitai proliferuodamos jos peraugtų bet kokius ląstelių hibridus. Dėl nefunkcionalių HGPRT genų buvimo, mielomos ląstelėse stabdomas nukleotidų sintezės (angl. *salvage pathway*) metabolinis kelias (Hnasko and Stanker, 2015). Tuo tarpu atrankos terpėje esantis aminopteras blokuoja ląstelių gebėjimą sintetinti nukleotidus *de novo* (Luckenbach, 1988). Tokiu būdu blokuojami abu nukleotidų sintezės keliai, kas lemia mielomos ląstelių žūtį. Nors aminopteras

blokuoja ir hibridomų *de novo* sintezės kelią, jos turi funkcionalius HGPRT genus, todėl nukleotidų sintezė vyksta kitu metaboliniu keliu (*salvage pathway*). Hipoksantinas ir deoksitimidinas padeda ląstelėms su funkcionaliais HGPRT genais išgyventi atrankos terpėje (Hnasko and Stanker, 2015). Taigi, HAT atrankos sistema yra pašalinamos visos ląstelės, išskyrus imortalizuotas ir funkcionalius HGPRT genus turinčias hibridomas. Po kelių augimo dienų HAT terpė yra nusiurbiamą ir ląstelės auginamos HT terpėje, kurioje nėra aminopterino. Terpėje nesant aminopterino *de novo* nukleotidų sintezės kelias nėra blokuojamas, todėl ląstelės pradeda greitai proliferuoti.

1.1.3 Imunofermentinė analizė

Vienas iš užaugusių hibridomų populiacijų testavimo būdų yra imunofermentinė analizė – ELISA (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Parray et al., 2020). Šis metodas yra plačiai taikomas klinikinėje diagnostikoje bei įvairaus pobūdžio moksliniuose tyrimuose, siekiant aptikti antikūnus ar kitus baltymus specifinius tiksliniam antigenui. Viena šio metodo variacijų yra netiesioginė *ELISA* (angl. *Indirect ELISA*) (Hnasko et al., 2011) (**2 pav.**). Tikslinis antigenas yra imobilizuojamas plokštelės šulinėlio paviršiuje, po to įpilamas tiriamos hibridomų augimo terpės mėginys. Jeigu mėginyje yra imobilizuotam antigenui specifinių antikūnų, jie prikimba prie antigeno. Tada įpilamas pirminiam antikūnui specifinis antrinis antikūnas su pririštu fermentu, tokiu kaip šarminė fosfatazė (angl. *alkaline phosphatase*) ar krienų peroksidazė (angl. *horseradish peroxidase*) (Hnasko et al., 2011) (**2 pav.**). Antrinis antikūnas prisijungia prie pirminio, o pridėjus pririšto fermento substrato vyksta reakcija, kurios metu susidaro spektrofotometru išmatuojamas spalvos pokytis.



2 pav. Netiesioginės imunofermentinės analizės schema. Sukurta naudojant BioRender.com

ELISA yra pakankamai paprastas, nebrangus ir aukštu specifiskumu bei jautrumu pasižymintis metodas. Pagal spalvinės reakcijos stiprumą yra nustatomos efektyviai antikūnus gaminančios hibridomos, kurios toliau yra klonuojamos naudojant tokius metodus kaip serijinis skiedimas (angl. *limited dilution cloning*) arba klonavimas klampioje terpėje (angl. *semi-solid media cloning*).

1.2 Antikūnai

Antikūnai – tai Y-formos baltymai (glikoproteinai), kuriuos gamina B limfocitai ir plazminės ląstelės reaguodamos į patogenus, tokius kaip virusai, bakterijos, grybai, nematodai ir kt. Antikūnai yra svarbi įgyto (angl. *adaptive*) imuniteto dalis, kadangi jie specifiskai atpažįsta ir prisijungia prie antigeno – patogeno molekulės, tiksliau jos dalių (epitopų). Prie antigeno prisijungusių antikūnų veikimo mechanizmai būna skirtingi. Vienas iš mechanizmų – opsonizacija, kurios metu antikūnai iš skirtingų pusių apsupa patogeną (pavyzdžiui, bakteriją ar virusą) ir prisijungia prie paviršiaus antigenų (Forthal, 2014). Patogeno opsonizacija aktyvuoja fagocitines ląsteles (makrofagus ir neutrofilus), kurios prisijungia prie antikūno-patogeno komplekso ir jį fagocituoja. Tokiu būdu antikūnai (opsoninai) palengvina patogeno atpažinimo bei sunaikinimo procesus. Kitas antikūnų veikimo mechanizmas yra patogenų neutralizavimas (Forthal, 2014), kurio metu antikūnai prisijungia prie bakterijų ar virusų gaminamų toksinų ir neleidžia jiems kontaktuoti su šeimininko ląstelėmis. Be to, prie antigeno prisijungę antikūnai inicijuoja klasikinį komplemento sistemos kelią (Mathern and Heeger, 2015). Jo eigoje įvyksta eilė reakcijų, kurių metu gaunamas C3b baltymas, dalyvaujantis patogeno opsonizacijoje bei komplemento baltymų kompleksas MAC (angl. *Membrane Attack Complex*), sukeliantis ląstelių lizę (Mathern and Heeger, 2015). Dėl skirtingų antikūnų veikimo mechanizmų ir plataus pritaikymo spektro, jie yra vertinami ne tik moksliniuose bei diagnostiniuose tyrimuose, bet ir įvairių ligų terapijoje.

Pagal specifiskumą antigeno epitopams antikūnai yra skirstomi į monokloninius (MAk) ir polikloninius (PAk). PAk gamina mišinys skirtingų plazminių ląstelių, todėl susidaro antikūnai, specifiniai skirtingiems antigeno epitopams (Stills, 2012). Kadangi dauguma antigenų turi kelis epitopus, esant antigenui stimuliuojama skirtingo specifiskumo antikūnus gaminančių B ląstelių diferenciacija į plazmines ląsteles. Antigeno stimuliuotos plazminės ląstelės gamina didelius kiekius antikūnų, specifiskų skirtingiems antigeno epitopams.

Lyginant su polikloniniais, monokloniniai antikūnai (MAk) yra specifiski tam pačiam antigeno epitopui (Parray et al., 2020). MAk gamyba pasižymi hibridomos, gaunamos suliejant antigenu imunizuoto gyvūno blužnies ląsteles su vėžinėmis mielomos ląstelėmis (Köhler and Milstein, 1975). MAk gamina hibridomų populiacija, kurią sudaro vienos tėvinės ląstelės identiškai klonai. Tokia

populiacija yra vadinama monoklonine. Per pastaruosius dešimtmečius buvo vystomi įvairūs MAK gamybos būdai, tokie kaip ląstelių kultūrų technologijos (Li et al., 2010) ar vieno limfocito antikūnų technologijos (angl. *Single lymphocyte antibody technology*) (Babcook et al., 1996), tačiau iki šiol efektyviausia ir dažniausiai naudojama yra hibridomų technologija.

1.2.1 Monokloninių antikūnų taikymai

Dėl MAK aukšto specifiskumo vienam antigeno epitopui ir MAK gaminančių ląstelių reproduktyvumo, jie yra plačiau taikomi negu PAK. Pagrindinės MAK taikymo sritys yra diagnostinių testų kūrimas, įvairaus pobūdžio moksliniai ir diagnostiniai tyrimai bei ligų terapija (Zola, 2010). Be to, MAK yra naudojami imunoafininėje chromatografijoje – baltymų bei kitų molekulių gryninime naudojant antikūnus. Šiuo būdu buvo gryninamos žmogaus MHC-II baltymų kompleksai naudojant 1:1 L243 ir Tü39 monokloninių antikūnų mišinius (Sturm et al., 2021). Chromatografinėje kolonėlėje imobilizuoti MHC-II specifiški MAK užtikrina tikslinės molekulės surišimą per antikūno-antigeno sąveikas bei lemia efektyvų gryninimo procesą. Taip pat MAK yra naudojami ląstelių identifikavime. 2014 m. Choi et al. panaudojo MAK diferencijavusių ir nediferencijavusių žmogaus embrioninių kamieninių ląstelių (angl. *human embryonic stem cells, hESC's*) detekcijai. Naudojant hibridomų technologiją buvo gauta 70 klonų, gaminančių antikūnus specifiskus hESC paviršiaus baltymams (Choi et al., 2014). Tokiu būdu buvo atskirtos diferencijavusios hESC nuo nediferencijavusių.

1.2.1.1 MAK taikymai diagnostikoje

MAK aukštas specifiskumas tiksliniam antigenui lemia jų platų taikymą įvairiose diagnostikos srityse, tokiose kaip imunohistochemija (IHC), imunocitochemija (ICC), imunofermentinė analizė (ELISA) bei imunochromatografiniai testai. IHC ir ICC MAK yra naudojami siekiant tiksliai identifikuoti antigenus audinyje ar ląstelėje. Ligų diagnostikoje naudojami MAK paremti IHC ir ICC testai yra jautrūs net mažiausiems tikslinio antigeno kiekiams mėginyje, todėl leidžia tiksliai nustatyti bei charakterizuoti susirgimą (Ramos-Vara and Miller, 2014). Pavyzdžiui, vėžinių ligų diagnostikoje yra naudojami MAK prieš p53 baltymą (anti-p53), kurio raiška yra dažnai padidėjusi esant navikui (Thiel et al., 2022). Fluorescencine žyme pažymėtas MAK prisijungia prie p53 baltymo. Lazeriu arba fluorescenciniu mikroskopu sužadintas fluoroforas atpalaiduoja energiją šviesos signalo pavidalu (Adeniyi et al., 2020). Detektuoto šviesos signalo stiprumas tiesiogiai koreliuoja su mėginyje esančio antigeno (p53) kiekiu. Toks testas padeda ne tik identifikuoti naviko buvimą, tačiau ir nustatyti potencialią naviko progresavimo kryptį bei galimas gydymo priemones. Taip pat MAK naudojami nustatant kraujo ląstelių populiacijų dydį mėginiuose. MAK prieš T ląstelių paviršiaus baltymą CD3

(anti-CD3) ir prieš B ląstelių paviršiaus baltymą CD20 (anti-CD20) identifikuoja bei charakterizuoja atitinkamai T ir B ląstelių populiacijas kraujo mėginiuose (Jefferis, 2019; Kuhn and Weiner, 2016). Anti-CD3 yra taikomi limfoproliferacinių sutrikimų diagnostikoje (Kuhn and Weiner, 2016), tuo tarpu anti-CD20 naudojami Ne Hodžkino limfomos (NHL) (Boye et al., 2003), lėtinės limfocitų leukemijos (CLL) (Bagacean et al., 2016) bei ūmios B ląstelių limfoblastinės leukemijos (B-ALL) diagnostikoje (Shi et al., 2022).

Viena iš labiausiai pažengusių MAK pritaikymo sričių yra diagnostiniai tyrimai, o ypač MAK pagrindu sukurti diagnostiniai testai, tiriantys kūno skysčius, tokius kaip kraujas ar šlapimas. Vienas iš pavyzdžių yra nėštumo testai, kurių metu MAK atpažįsta ir prisijungia prie nėščios moters šlapime esančio placentos hormono gonadotropino (angl. human chorionic gonadotropin, hCG) (Cole, 2009). Nėštumo teste dalyvauja trys skirtingi MAK: tam tikram hCG epitopui specifiški MAK su imobilizuotu spalvinės reakcijos elementu (detekcijos antikūnai), ant imunochromatografinio testo membranos imobilizuoti MAK specifiški kitam hCG epitopui (angl. *capture antibody*) bei kontrolei naudojami MAK specifiški detekcijos antikūnams. Mėginyje esant hGC, detekcijos MAK prisijungia prie hormono ir suformuoja kompleksą (Cole, 2009). Šlapimo mėginys veikiamas kapiliarinių jėgų juda link regiono su imobilizuotais MAK, specifiskais kitam hGC epitopui. hGC-detekcijos antikūnų kompleksas prisijungia prie imobilizuotų MAK ir įvyksta spalvinė reakcija – susiformuoja jusotelė signalizuojanti apie teigiamą nėštumo testo rezultatą (Cole, 2009). Komplexo nesuformavusius detekcijos MAK prisijungia kontrolės antikūnai – išryškėja kontrolės juostelė signalizuojanti apie teisingą testo veikimą.

1.2.1.2 MAK taikymai vėžinių ligų terapijoje

Sulyg kiekvienais metais MAK vis dažniau naudojami vėžinių ligų terapijoje (Zahavi and Weiner, 2020). Pagrindinė to priežastis – MAK gebėjimas atpažinti ląstelės paviršiaus antigeną ir sukelti imuninį atsaką. Vėžinėje imunoterapijoje antigeną atpažinę MAK aktyvuoja nuo komplemento baltymų priklausomą citotoksiškumą (angl. *complement dependent cytotoxicity, CDC*) arba nuo antikūnų priklausomą citotoksiškumą (angl. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC*), kurie sukelia antikūnu pažymėtų ląstelių žūtį (Carter, 2001). MAK taip pat gali blokuoti vėžinių ląstelių gaminamus augimo faktorius, kas slopina naviko ląstelių proliferaciją (Zahavi and Weiner, 2020).

Rituximab (IDEC-C2B8) yra chimerinis monokloninis antikūnas prieš CD20 antigeną. Jis yra naudojamas Ne Hodžkino limfomos (NHL) terapijoje. Rituximab prisijungia prie B ląstelių paviršiaus baltymo CD20, kurį turi tiek piktybinės tiek normalios B ląstelės. Prie CD20 prisijungęs rituximab indukuoja CDC bei ADCC (Coiffier, 2007). Nors vėžinės ląstelės yra labiau jautrios CDC

ir ADCC, rituximab imunoterapijos metu žūsta ir normalios B ląstelės, kas lemia žmogaus susilpnėjusį imunitetą.

Imuninio atsako inicijavimas nėra vienintelis vėžinių ligų terapijoje naudojamų MAk veikimo mechanizmas. Krūties vėžio diagnostikoje ir terapijoje naudojamas trastuzumab prisijungia prie epiderminių ląstelių augimo faktoriaus receptoriaus HER-2 ir jį užblokuoja, todėl ląstelės nustoja augti (Albanell et al., 2003). Tokiu pačiu principu veikia Nimotuzumab, kuris prisijungia prie epiderminio augimo faktoriaus receptoriaus (EGFR), kuris kontroliuoja ląstelių dalijimąsi. Šis MAk blokuoja EGFR ir stabdo nekontroliuojamą ląstelių proliferaciją (Rivera et al., 2008).

1.3 Žinduolių ląstelių klonavimas

Biofarmaciniai preparatai – tai genetiškai modifikuoti terapiniai baltymai, pavyzdžiui, monokloniniai antikūnai, arba nukleorūgščių produktai, tokie kaip mRNR vakcinos, modifikuota DNR genų terapijai (Walsh, 2006). Biofarmacinių preparatų rinka ($\approx$ 350 mlrd. JAV dolerių) sudaro apie ketvirtadalį visos pasaulinės vaistų rinkos ir, anot *BioSpace.com*, iki 2030 metų jos vertė išaugs iki 856 mlrd. JAV dolerių. Toks rinkos augimas prognozuojamas dėl biofarmacinių vaistų plataus pritaikymo autoimuninių ir vėžinių ligų gydyme, personalizuotoje medicinoje, vakcinų gamyboje, genų ir ląstelių terapijoje. Šių vaistų gamyboje yra naudojamos skirtingos raiškos sistemos: bakterijos (*Escherichia coli*), mielės (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), vabzdžiai ir augalai, tačiau žinduolių ląstelės yra populiariausios biofarmacinių preparatų gamyboje dėl jų panašumo žmogaus ląstelėms (Browne and Al-Rubeai, 2007). Šis faktorius yra labai svarbus, kadangi paciento gydymui naudojant žmogui negiminingose raiškos sistemose (bakterijose, mielėse) gaminamus baltymus gali sumažėti preparato efektyvumas arba kilti imuninis atsakas (Wurm, 2004). Gram-neigiamų bakterijų išorinėje membranoje lokalizuoti lipopolisacharidai (LPS) – endotoksinais – yra dar viena kliūtis kylanti preparatų gamyboje naudojant bakterijas. Terapeutiniame produkte esantys endotoksinais gali sukelti stiprias uždegimo reakcijas, audinių pažeidimus ar net septinį šoką (Schneier et al., 2020). Žinduolių ląstelių linijos endotoksinų negamina, todėl preparato užsiteršimo endotoksinais tikimybė sumažėja. Taip pat tarp skirtingų raiškos sistemų skiriasi baltymo postransliacinės modifikacijos – fosforilinimo, glikozilinimo, acetilinimo laipsniai, todėl žmogaus terapijoje efektyviausiai veikiantys biofarmaciniai preparatai gaunami iš žinduolių ląstelių.

Terapinių baltymų gamyboje vienas pagrindinių reikalavimų ląstelių kultūrai yra monokloniškumas (Barnes et al., 2006) – ląstelių populiacijos išsivystymas iš vienos pirminės ląstelės. Teoriškai, tai turėtų užtikrinti, kad populiacijoje visos ląstelės yra genetiškai identiškos, tačiau praktiškai – neįmanoma gauti visiškai homogenišką populiaciją. Net labai plačiai naudojamos

ląstelių linijos, tokios kaip CHO (angl. *Chinese Hamster Ovary*), pelių mielomos linijos NS0 (angl. *non-secreting subclone*) ir hibridomų linijos rodo daug nukrypimų, susijusių su augimo greičiu ir specifinio baltymo gamyba (Browne and Al-Rubeai, 2007). Vykdam pakartotinius klonavimus, ląstelių populiacijos heterogeniškumas sumažėja, tačiau neišnyksta (Marder et al., 1990), o tai daro neigiamą įtaką produkto išeigai. Dėl šios priežasties, norint stabilizuoti ląstelių populiacijų augimo savybes ir pagerinti gaminamų produktų išeigą yra svarbu turėti greitus ir ekonomiškus metodus, kuriais iš heterogeniškos ląstelių populiacijos galime atrinkti produktyvias ląsteles.

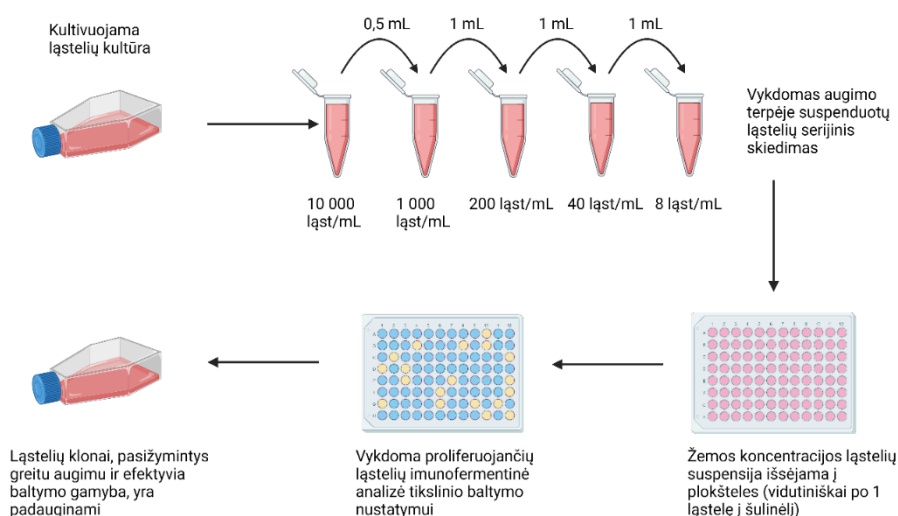
1.3.1 Žinduolių ląstelių klonavimo būdai

Klonas – tai ląstelių populiacija, kurią sudaro išskirtinai vienos ląstelės palikuonės (Ham, 1972). Pirmi žinduolių ląstelių klonavimo bandymai buvo atlikti naudojant kapiliarinius vamzdelius, kurie fiziškai apribodavo terpės tūrį aplink pavienę ląstelę (Sanford et al., 1948), kas užtikrino monokloninės populiacijos augimą. 1955 m. Puck & Marcus pasiūlė kitą būdą, kuomet terpėje buvo naudojamas maitinamasis ląstelių sluoksnis (angl. *feeder layer*). Šioms ląstelėms prieš naudojimą buvo užkirstas kelias proliferuoti dėl stiprios iradiacijos, todėl jos nekonkuravo su klonuojamomis ląstelėmis, o tik skatino jų augimą ir proliferaciją. Klonavimo metodikos pasirinkimas labai priklauso nuo ląstelių kultūros tipo. Suspensinių ląstelių kultūrų klonavimas yra palyginus sudėtingesnis nei adhezinių ląstelių kultūrų, kadangi pastarosios gali būti klonuojamos Petri lėkštesėse, flakonuose ar plokštelėse. Adhezinių ląstelių kolonijos yra lengvai atrenkamos, kadangi proliferuodamos jos išlieka šalia kitų populiacijos ląstelių (Browne and Al-Rubeai, 2007). Tuo tarpu, norint gauti monokloninę suspensinių ląstelių populiaciją, svarbu jas imobilizuoti, sėjant ląsteles į gelio pavidalo terpę (agarozės pagrindu) ar į klampią metilceliuliozės terpę (Davis, 2004). Kitas būdas – suspensines ląsteles skiesti ir izoliuoti vieną nuo kitos, kas lemia populiacijų augimą iš vienos ląstelės (Puck and Marcus, 1955).

1.3.2 Serijinis skiedimas

Vienas dažniausiai naudojamų metodų ląstelių klonavimui yra serijinis skiedimas (**pav. 3**) (angl. *limited dilution cloning, LDC*) (Puck and Marcus, 1955). Nors šis būdas reikalauja daug darbo ir lyginant su kitais metodais yra žemo našumo, jis yra santykinai paprastas ir pigus. LDC metodo pagrindinis principas yra mažai ląstelių turinčios suspensijos išsėjimas į 96 šulinėlių plokštelę taip, kad kiekviename šulinėlyje būtų statistiškai po vieną ląstelę (Browne and Al-Rubeai, 2007). Auginant ląsteles šulinėliai yra stebimi mikroskopu ir tolesnei analizei naudojami tik po vieną ląstelių kloną turintys šulinėliai (Browne and Al-Rubeai, 2007). Susidariusios ląstelių populiacijos (klono) produktyvumas yra tiriamas naudojant metodus, tokius kaip ELISA (Browne and Al-Rubeai, 2007).

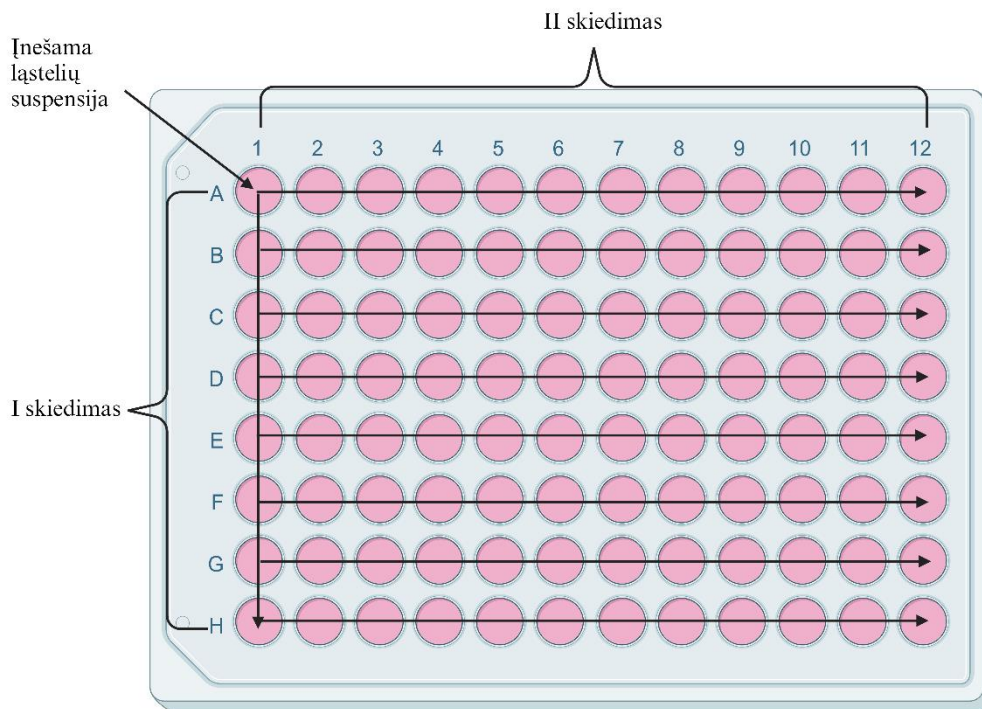
Jei gautas klonas pasižymi efektyvia tikslinio baltymo gamyba, rekomenduojama atlikti pakartotinį klonavimą, kuris padidins monokloninės populiacijos izoliavimo tikimybę.



3 pav. Serijinio skiedimo metodo schema. Sukurta naudojant *BioRender.com*

Klonuojant žinduolių ląsteles, tame tarpe ir hibridomas, naudojama ir kita LDC metodo alternatyva (**4 pav.**). Ląstelės yra išsėjamos ir auginamos 96 šulinėlių plokštelėse. Priaugus ląstelių, jos yra testuojamos netiesioginės imunofermentinės analizės būdu (ELISA) ir identifikuojamos efektyviai tikslinį baltymą gaminančios populiacijos. Šių populiacijų ląstelės yra surenkamos iš šulinėlio ir skiedžiamos į kitą 96 šulinėlių plokštelę (**4 pav.**). Tokiu būdu, 10-12-tame plokštelės stulpeliuose ląstelės atskiedžiamos iki labai žemų koncentracijų (1-10 ląstelių viename šulinėlyje). Ląstelėms proliferuojant formuojasi klonai, kurie yra dar kartą testuojami ir klonuojami LDC būdu, kadangi kuo daugiau pakartotinių klonavimų atlikta, tuo didesnė tikimybė gauti stabilią monokloninę populiaciją.

Stabilių hibridomų klonų, sekretuojančių tikslinį antikūną, izoliavimas yra ilgiausiai užtrunkantis hibridomų technologijos etapas. Tačiau, norint gauti ląstelių liniją, pasižyminčią efektyvia ir stabilia tikslinio antikūno sekrecija, svarbu užtikrinti, kad populiacija būtų monokloniška (Greenfield, 2019). Nors LDC metodas yra paprastas ir pigus, jis reikalauja daug laiko resursų ir negarantuoja, kad izoliuota ląstelių populiacija bus monokloniška (Staszewski, 1990).



4 pav. Ląstelių skiedimo schema. Sukurta naudojant BioRender.com

1.3.3 Ląstelių klonavimas klampioje terpėje ir robotizuota ląstelių klonų atrankos sistema

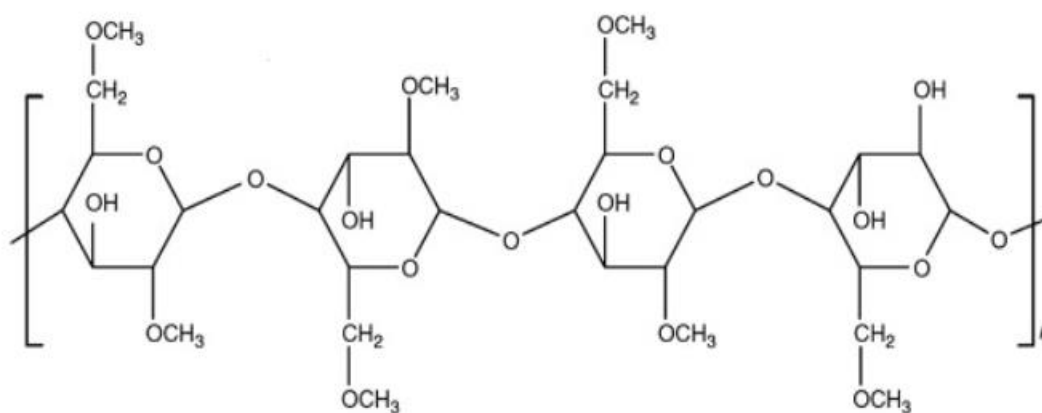
Ląstelių auginimas klampioje terpėje ir susidariusių klonų izoliavimas robotizuotų sistemų pagalba yra dar vienas monokloninių populiacijų atrankos būdas. Tokios sistemos yra naudojamos hibridomų (Browne and Al-Rubeai, 2007), CHO ląstelių (Caron et al., 2009) augimo stebėjimui ir klonų atrankai. Klampioje terpėje auginamos ląstelės yra imobilizuojamos ir atskiriamos viena nuo kitos, kas užkerta kelią ląstelių maišymuisi ir užtikrina vienos ląstelės palikuonių buvimą kartu. Be to, naudojant klampią terpę sumažėja ląstelių gaminamų produktų difuzija, todėl sekretuojami baltymai išlieka šalia klonų (Caron et al., 2009). Naudojant fluorescuojančią žymę pažymėtus antikūnus prieš sekretuojamą baltymą galima identifikuoti aukšto produktyvumo klonus, juos izoliuoti ir reklonuoti (Caron et al., 2009). Kitas būdas nustatyti aukšto produktyvumo klonus – izoliuoti visus užaugusius ir naudotojo reikalavimus atitinkančius klonus ir, juos paauginus 96 šulinėlių plokštelėse, tirti naudojant tokius metodus kaip ELISA ar Western blot'as. Robotizuotos atrankos sistemos yra naudojamos siekiant greitai ir tiksliai izoliuoti klonus užaugusius klampioje terpėje. Viena iš tokių robotizuotų sistemų yra Clonepix 2 iš *Molecular Devices* (www.moleculardevices.com). Ši sistema pagal nurodytus kriterijus vizualizuoja, atrenka ir perkelia klonus iš vienos plokštelės į kitą (Mann, 2007). Klonai transportuojami steriliomis adatėlėmis ir izoliuojami nuo kitų klonų, taip jie yra apsaugomi nuo kontaminacijos kitomis ląstelėmis (Mann,

2007). Dėl šios priežasties, klonai, susidarę iš vienos ląstelės, išlieka monoklonais po jų izoliavimo ir tolesnės inkubacijos metu (Dharshanan et al., 2011). Naudojant Clonepix 2 robotizuotą sistemą padidėja tikimybė izoliuoti produktyvias ląstelių linijas, sutaupoma daug darbo ir laiko resursų.

1.4 Metilceliuliozė

1.4.1 Metilceliuliozės cheminės savybės

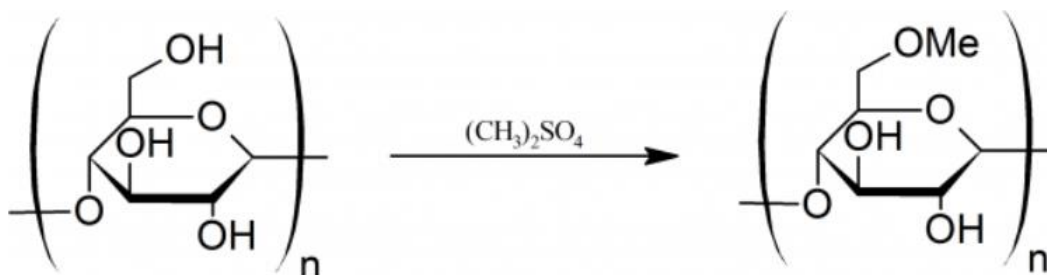
Metilceliuliozė (MC) (**5 pav.**) yra sintetinis junginys gaunamas iš polisacharido celiuliozės, kuri yra pagrindinis augalų ląstelių sienelių komponentas (Miyamoto et al., 1989). MC yra tirpi vandenyje, tačiau taip pat tirpi organiniuose tirpikliuose bei mišriuose tirpikliuose (vanduo/etanolis) (Nasatto et al., 2015). Metilceliuliozės (celiuliozės metilo eterio) metoksi grupių kiekis varijuoja nuo 27,5 iki 31,5 % (Park and Ruckenstein, 2001). MC metilinimo laipsnis lemia skirtingą tankį, tirpumą bei klampumą. Pavyzdžiui, žemesnio metilinimo laipsnio MC yra tirpi šaltame vandenyje ($< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), tačiau prasčiau tirpsta karštame ($> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Franz, 1986), tuo tarpu didėjant metilinimo laipsniui hidrofilinės grupės yra užmaskuojamos, todėl tirpumas suprastėja. Lyginant su celiulioze, metilceliuliozė yra tirpesnė vandenyje dėl metilo grupių, prisijungiančių vietoje celiuliozės hidroksi grupių. Hidrofilinių (-OH) ir hidrofobinių (-CH₃) funkcinų grupių buvimas molekulėje pagerina MC gebėjimą formuoti vandenilinius ryšius su vandens molekulėmis bei taip pat išsaugo junginio hidrofobines savybes. Tokia subalansuota funkcinų grupių kombinacija lemia klampaus tirpalo ar gelio susidarymą vandenyje tirpinant MC (Brady et al., 2017).



5 pav. Metilceliuliozės cheminė formulė. Brady et al., 2017.

MC yra gaunama šarmu apdorotą celiuliozę veikiant metilo chloridu arba dimetil sulfatu (Franz, 1986) (**6 pav.**). Gryninimas vyksta reakcijos mišinį plaunant karštu ($60\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$) vandeniu, kadangi MC veikiant aukšta temperatūra formuojasi gelio struktūros (Grover, 1993). Tirpinama vandenyje

MC išbrinksta ir formuoja skaidrų, klampų, bekvapį tirpalą arba gelio struktūrą (priklausomai nuo tirpinamos MC kiekio). Plačiame pH intervale – nuo 2 iki 12 – MC tirpalai lieka stabilūs ir išlaiko vienodą klampumo lygį (Franz, 1986), tačiau lėtai degraduoja stipriose rūgštyse ir šarmuose (Nasatto et al., 2015).



6 pav. Metilceliuliozės sintezės schema. Preparation of Methylcellulose, 2019.

1.4.2 Celiuliozės darinių taikymai

Dėl savo unikalių savybių celiuliozė ir jos sintetiniai dariniai jau ilgą laiką yra plačiai taikomi įvairiose srityse: maisto pramonėje (Burdock, 2007), farmacijoje (Floury et al., 2003; Masahiro et al., 1980), biomedicinoje (Akizawa et al., 1987; Spencer et al., 1985), kosmetikoje (Burdock, 2007), taip pat popieriaus, tekstilės bei statybinių medžiagų gamyboje. Viena iš šių junginių savybių lemiančių platų pritaikymo spektrą yra skirtingas tirpumas vandenyje. Tokie junginiai kaip metilceliuliozė (MC), karboksimetilceliuliozė (CMC) yra tirpūs vandenyje ir panaudojami klampių tirpalų ar gelių gamyboje, tuo tarpu etilceliuliozė yra tirpi tik organiniuose tirpikliuose (acetone, chloroforme, etanolyje), todėl naudojama tada, kai siekiama apsaugoti produktą nuo kontakto su vandeniu (Grover, 1993). Taip pat celiuliozės junginiai garsėja gebėjimu keisti reologines tirpalų savybes – šie polimerai veikia kaip tirštikliai, taip pagerindami įvairių produktų tekstūrą ir stabilumą (Floury et al., 2003). Celiuliozė yra natūralus polimeras, todėl yra laikomas ekologiškai saugiu dėl savybės degraduoti natūralioje aplinkoje. Be to, chemiškai modifikuotos celiuliozės nėra toksiškos ir nedemonstruoja mutageninio ar karcinogeninio aktyvumo (Zobel, 1976), kas užtikrina jų saugų pritaikymą maisto pramonėje, biomedicinoje bei farmacijoje.

1.4.2.1 Metilceliuliozės ir jos darinių taikymai maisto pramonėje

Įvairiose srityse MC yra dažniausiai pritaikoma kaip tirštiklis, emulsiklis ar stabilizatorius. MC ir plačiausiai naudojami MC sintetiniai dariniai – HPMC (hidroksipropilmetilceliuliozė) ir CMC – yra labai plačiai taikomi skirtingose maisto pramonės srityse kaip: kepimo produktų komponentai, tešlos komponentai, alaus stabilizatoriai, saldinių ir pyragų stabilizatoriai, konservuotus produktus

dengiančios plėvelės, valgomosios maisto pakuotės pagrindas. (Glicksman, 1963). Konditerijoje MC naudojama stabilizuojant tekstūrą ir stangrumą tokių produktų kaip ledai ir jogurtai. Be to, MC dedama į kai kuriuos mėsos produktus norint patobulinti mėsos sultingumą ir švelnumą. MC ir HPMC yra dažnas salotų padažų (Grover, 1993), mėsos padažų (Glicksman, 1963) komponentas, kadangi naudojant šiuos polimerus yra išvengiama ingredientų išsibarstymo bei stabilizuojama emulsija. CMC yra pritaikoma gėrimų gamyboje. Buvo pastebėta, kad pridėdant nedidelius kiekius CMC į alaus gėrimus yra formuojamos stabilios baltos putos, kurios didina produkto patrauklumą ir sukuria apsauginį sluoksnį tarp alaus ir oro (Glicksman, 1963).

1.4.2.2 Metilceliuliozės ir jos darinių taikymai farmacijoje ir biomedicinoje

Celiuliozė ir jos dariniai nėra skaidomi žmogaus virškinimo sistemos, todėl gali būti pritaikomi vaistų gamyboje. Kietos vaisto dozavimo formos – tabletės, kapsulės, granulės – dažnai yra dengiamos papildomu sluoksniu siekiant apsaugoti jautrias veikliąsias medžiagas nuo vaisto degradavimo, drėgmės, deguonies poveikio ir kitų nepalankių aplinkos sąlygų (Shokri et al., 2013). Taip pat dengiamasis sluoksnis užmaskuoja tam tikrų vaistų nemalonų skonį ir užtikrina vaisto pristatymą iki tikslios vietos. Celiuliozės eteriai ir esteriai yra plačiai naudojami vaistų dengiamųjų sluoksnių gamyboje (Shokri et al., 2013). MC ir HPMC yra taikomi vaistų ir papildų kapsulių gamyboje. Šie junginiai yra valgomi ir netoksiški, todėl gali būti alternatyva želatinai (Podczek and Jones, 2004). MC ir HPMC yra tirpūs vandenyje, todėl užtikrina vaisto dengiamojo sluoksnio ištirpimą organizme.

Judėdama per virškinimo traktą MC išlieka nesudegraduota ir sugeria didelius kiekius vandens. Dėl šios priežasties MC yra naudojama vidurių užkietėjimo gydymui ar simptomų lengvinimui (Nasatto et al., 2015). Taip pat MC yra dažnas komponentas vaistų nuo hemorojaus ir divertikuliozės. Dėl MC savybės sugerti vandenį ir potencialiai toksines medžiagas, padidėja ekskrementų tirštumas, ir atitinkamai palengvėja viduriavimo simptomai (Nasatto et al., 2015).

HPMC yra plačiai taikoma lokalių vaisto tiekimo sistemų (angl. *drug delivery system*) gamyboje (Pan et al., 2023; Rahman et al., 2011; Siepmann and Peppas, 2012). Pagrindinis tokių sistemų tikslas yra efektyvus veikliosios medžiagos pristatymas į tikslią organizmo vietą ir tolygus vaisto tiekimas laiko skalėje. Tiekiant vaistą į tikslią sritį yra padidinamas veikliosios medžiagos teraputinis efektyvumas ir sumažinami šalutiniai poveikiai organizmui. Be to, lokalių vaisto tiekimo sistemų naudojimas padeda kontroliuoti tolygų vaisto tiekimą bėgant laikui, kas sumažina dozavimo dažnį bei pagerina paciento prisitaikymą prie vaisto (Brannon-Peppas, 1990). Tokia sistema dažniausiai tarnauja hidrogeliai – homogeninės trimatės polimerų struktūros, gebančios sulaikyti didelius kiekius vandens (Pan et al., 2023). Hidrogelių gamyboje svarbiausia HPMC charakteristika yra išbrinkimas

vandenyje (tūrio padidėjimas) – ši savybė daro tiesioginę įtaką hidrogelyje įkorpuoto vaisto tiekimo kinetikai (Siepmann and Peppas, 2012). HPMC hidrogeliui kontaktuojant su vandeniu ar kitais organizmo skysčiais įvyksta medžiagų mainai, kurių metu vanduo patenka į hidrogelį, o įkorpuotos vaisto molekulės atsikabina ir difunduoja iš sistemos (Brannon-Peppas, 1990).

1.4.2.3 Metilceliuliozės ir jos darinių taikymai ląstelių auginimui

Metilceliuliozė ir jos dariniai yra netoksiški ląstelėms (Podczek and Jones, 2004), todėl gali būti naudojami kaip augimo terpės komponentai. Dažniausiai šie junginiai naudojami norint gauti tirštą, klampią terpę, kurioje ląstelės būtų fiziškai atskirtos viena nuo kitos ir nesimaišytų kaip tai vyksta skystoje terpėje. Toks fizinis barjeras naudingas siekiant gauti monoklonines ląstelių populiacijas, išaugusias iš vienos pirminės ląstelės.

1970 m. Walters et. al siekė klonuoti CHO (angl. *Chinese Hamster Ovary*) ląsteles naudojant karboksimetilceliuliozės (CMC) pagrindu pagamintą terpę. Jie naudojo CMC koncentracijas nuo 0,3 iki 1,2 %, o susidariusias kolonijas stebėjo po 4-6 dienų. Buvo nustatyta, kad CHO ląstelių gebėjimas formuoti kompaktiškus sferinius klonus, nepasiduodančius fragmentacijai (nesuskylančius manipuliuojant) labai priklauso nuo CMC koncentracijos (optimali CMC koncentracija 0,93%). Mažinant CMC koncentraciją terpėje formuojami nestabilūs, netaisyklingos formos klonai, tuo tarpu didinant CMC koncentraciją – nukenčia ląstelių augimo greitis (Walters, Hutson and Burchill, 1970).

MC taip pat buvo panaudota klampios (angl. *semi-solid*) terpės gamyboje, sėjant pelės (*Mus musculus*) vėžines ląsteles į 1.2 % MC terpę su 10 % veršiuko serumo (Freedman and Shin, 1974). Žmogaus neuroblastomos ląstelės buvo sėkmingai auginamos ir klonuojamos 1 % MC terpėje (Ito et al., 1987). Be to, MC savybė sugerti didelius kiekius skysčio yra panaudojama kuriant ląstelių agregatus (Kojima et al., 2012). Tam yra naudojama sąlyginai aukšta MC koncentracija (3 %). Kai lašelis skystos terpės su jame suspenduotomis ląstelėmis yra suleidžiamas į MC terpę, skysta terpė yra sugerama, tuo tarpu ląstelės susispaudžia ir formuoja kompaktiškus agregatus (Kojima et al., 2012). Hibridomas – pagrindinį šio darbo objektą – taip pat pavyko klonuoti MC pagrindu paruoštoje klampioje terpėje (Kennett et al., 1980). 1982 m. Davis et al. rado paprastą būdą hibridomų atranką ir klonavimą vykdyti vieno etapo metu, sėjant kaitik sulietas ląsteles į MC pagrindu paruoštą klampią terpę, kurioje kartu yra visi HAT atrankos sistemos komponentai.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Ląstelių linijos

Stabilios hibridomų ląstelių linijos 5H6, 12E12, 25E6 (Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras Biotechnologijos institutas (VU GMC BTI) Imunologijos skyrius, dr. Martynas Simanavičius);

Sp2/0-Ag14 (CRL-1581) mielomos ląstelių linija (ATCC, JAV).

2.1.2 Reagentai

Dejonizuotas vanduo;

DMSO (Sigma, JAV);

Etanolis 96 % (Vilniaus degtinė, Lietuva);

H₂SO₄ (Honeywell, Vokietija);

HCl (Roth, Vokietija);

Kalio chloridas (Roth, Vokietija);

Mikrozid AF skystis paviršių dezinfekcijai (Schülke, Vokietija);

Natrio hidrokarbonatas (NaHCO₃) (Roth, Vokietija);

NaOH (Chempur, Lenkija)

Polietilenglikolis (PEG-4000) (Sigma-Aldrich, JAV);

TMB peroksidazės substratas imunofermentinei analizei (Clinical science products Inc., JAV);

Tween-20 (Roth, Vokietija).

2.1.3 Antikūnai, antigenai, kiti baltymai ir rinkiniai

Rekombinantiniai baltymai rhBiP, CNX, CRT ir ERp57 (VU GMC BTI Eukariotų genų inžinerijos skyrius, Dr. Evaldas Čiplys ir Dr. Rimantas Slibinskas);

Antriniai ožkos antikūnai prieš pelės IgG žymėti su krienų peroksidazės fermentu (Bio-Rad IgG(H+L)-HRP #1721011);

Jaučio serumo albuminas, BSA (angl. *bovine serum albumin*) (PAN-Biotech, Bovine Serum Albumin Fraction V);

Pelės imunoglobulinų izotipų nustatymo ELISA rinkinys BD Pharmigen „Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit“ (BD Biosciences, JAV);

Polikloniai antikūnai prieš CNX baltymą (VU GMC BTI Imunologijos skyrius).

2.1.4 Ląstelių augimo terpės ir priedai

Ląstelių mitybinės terpės DMEM (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) milteliai (Gibco, JAV);

Ląstelių mitybinė terpė DMEM (PAN-Biotech, Vokietija; Corning, JAV);

Terpės priedai:

Fetalinis veršiuko serumas (FVS) (angl. FBS, Fetal Bovine Serum) (Sigma-Aldrich, JAV);

Gentamicino sulfatas (Roth, Vokietija);

Metilceliuliozė 4000 cP (Sigma-Aldrich, JAV);

Terpės priedas HAT (50×) (hipoksantinas, aminopterinas, timidinas) (Sigma-Aldrich, JAV);

Terpės priedas HT (50×) (hipoksantinas, timidinas) (Sigma-Aldrich, JAV).

2.1.5 Tirpalai

0,4 % tripano mėlio tirpalas (Gibco by Life Technologies, JAV);

0,5 M, 3,6 % H₂SO₄ tirpalas;

6 M natrio šarmas (NaOH);

32 % druskos rūgšties tirpalas (HCl);

PBS – NaCl, KCl, Na₂HPO₄ (Roth, Vokietija);

PBS-T – PBS su 0,1 % Tween-20;

ELISA plovimo tirpalas (1:1 PBS-T:H₂O);

Sotus (NH₄)₂SO₄ tirpalas (Roth, Vokietija).

2.2 Įranga, prietaisai ir priemonės

0,2 μm filtrinis popierius (Whatman, Anglija);

0,5, 1,5 ir 5 mL plastikiniai mėgintuvėliai (Eppendorf, Vokietija; Nerbe plus, Vokietija);

2 mL ir 5 mL sterilūs švirkštai (BD Discardit; BD Emerald, Ispanija);

1 mL kriomėgintuvėliai ląstelių šaldymui (Fisherbrand, JAV);

15 mL ir 50 mL sterilūs mėgintuvėliai (Nerbe plus, Vokietija);

25 cm² ir 75 cm² ląstelių kultūrų auginimui skirti flakonai (Thermo Scientific, JAV);

5, 10, 25, 50 mL sterilūs antgaliai serologinei pipetei (Thermo Scientific, JAV, Pietų Korėja, Vokietija);

6, 24 ir 96 šulinėlių plokštelės ląstelių kultūrų auginimui (TPP, Šveicarija);

96 šulinėlių ELISA plokštelės Maxisorp ir Polysorp (Nunc, Danija);

Svarstyklės Kern PCB 1000-12 (KERN & SOHN, Vokietija);

Automatinės 8 ir 12 kanalų mikrotūrių pipetės pipetė (30-300 μL) (Thermo Scientific, JAV);

Automatinės mikrotūrių pipetės (0,2-2 μL; 10-100 μL; 20-200 μL; 0,5-5 mL; 1-10 mL) (Eppendorf, Vokietija; Gilson, JAV; Rainin, JAV; Thermo Scientific, JAV);

CO₂ ląstelių inkubatorius (Binder, Vokietija);

Centrifuga Universal 32 (Hettich Zentrifugen, Vokietija);
Dengiamasis stikliukas (Sigma-Aldrich, JAV);
500 mL filtravimo įranga su 0,2 µm aPES membrana (Fisherbrand, JAV);
Hemocitometras *Bürker* (Sigma, JAV);
Inversinis mikroskopas Eclipse TS100 (Olympus, Japonija);
Laminarinės oro tėkmės spintos (ESCO, Singapūras; Thermo Scientific, JAV);
Magnetinė maišyklė (Thermo Scientific, JAV);
Orinis termostatas (Mettler, Vokietija);
pH-metras MP220 (Mettler Toledo, JAV);
Serologinė pipetė (Thermo Scientific, JAV);
Plokštelių purtyklė (IKA, Vokietija);
Robotizuota klonų atrankos sistema Clonepix 2 (Molecular Devices, JAV);
Spektrofotometras Multiskan GO (Thermo Scientific, JAV);
Sterilūs plastikiniai loveliai (Titertek, Didžioji Britanija);
Suskystinto azoto diuaras ThermoLyne Biocane 47 (Thermo Scientific, JAV);
Šaldymo įranga -70 °C, -20 °C, 4 °C (Bosh, Liebherr, Vokietija; Snaigė, Lietuva);
Vandeninis termostatas (Mettler, Vokietija);
Vienkartinės pirštinės (Ansell, Kinija);
Vienkartiniai automatinių pipetių antgaliai (10 µL, 200 µL, 1000 µ, 5 mL ir 10 mL) (Nerbe plus, Vokietija; Thermo Scientific, JAV).

2.3 Metodai

2.3.1 Ląstelių atšildymas, auginimas ir kriokonservavimas

5H6, 12E12 ir 25E6 hibridomų linijos yra laikomos skystame azote (≈ -196 °C). Iš diuaro su skystu azotu išimama šaldymo ampulė ir nupurškiama dezinfekciniu skysčiu. Laminarinėje traukos spintoje ląstelės yra atšildomos mėgintuvėlio turinį suspenduojant standartinėje DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) terpėje be serumo ir su 0,024 % (m/v) antibiotiko gentamicino. Ląstelės išsėjamos į 25 cm² flakonus, terpės tūris flakone privedamas iki 10 mL. Hibridomos auginamos 9 % FVS DMEM terpėje su 0,016 % (m/v) gentamicino. Priaugus ląstelėms, jos persėjamos į 75 cm² flakonus (20 mL augimo terpės) ir juose kultivuojamos, kol vykdomi tyrimai.

Esant poreikiui, eksperimentams nebenaudojamos ląstelės yra vėl užšaldomos. Švelniai plaunant flakono dugną terpe ląstelės yra atkeliamos ir suspenduojamos augimo terpėje. Ląstelių suspensija centrifuguojama 5 min 200 × g, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 700 µL šaldymo

terpės ir perkeliama į šaldymo ampulės. Šaldymo ampulės su ląstelėmis laikomos šaldiklyje (-70 °C) ir po paros perkeliama į skysto azoto diuarą.

2.3.2 Ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumo vertinimas

Ląstelės iš flakonų surenkamos jas švelniai suspenduojant augimo terpėje ir perkelti į sterilų mėgintuvėlį. Ląstelių suspensija yra centrifuguojama 5 min 200 × g kambario temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 1 mL PBS. Paimamas 10 µL ląstelių suspensijos mėginys ir sumaišomas santykiu 1:1 su 0,4 % tripano mėlio tirpalu. Po hemocitometro dengiamuoju stikliuku įnešama 10 µL ląstelių suspensijos su tripano mėliu. Ląstelių kiekis ir gyvybingumas įvertinamas mikroskopuojant.

Negyvų ląstelių plazminė membrana yra laidus tripano mėliui, todėl žuvusios ląstelės nusidažo mėlynai, o gyvos ląstelės lieka skaidrios. Ląstelių gyvybingumas įvertinamas pagal formulę:

$$G = \frac{g}{(g + z)} \times 100 \%$$

Kai G – ląstelių gyvybingumas (%); g – gyvų ląstelių skaičius; z – žuvusių ląstelių skaičius.

2.3.3 Darbas su laboratoriniais gyvūnais

Hibridomų gamyboje naudojamos imunizuotų BALB/c suaugusių pelių linijos ląstelės, peritoniniai makrofagai ir blužnis. Tyrimams naudojamos pelės auginamos VU GMC Biochemijos instituto vivariume. Darbams išduotas Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti bandymų su gyvūnais projektą nr. G2-117. Visas su bandomaisiais gyvūnais atliekamas procedūras atliko VU GMC BTI Imunologijos skyriaus darbuotojai turintys leidimus dirbti su laboratoriniais gyvūnais. Eksperimentai buvo atliekami laikantis darbo su bandomaisiais gyvūnais reikalavimų.

Pelė imunizuota 4 kartus kas 28 dienas po 50 µg CNX baltymo 200 µl tūryje į poodį. Pirmosios imunizacijos metu naudotas pilnas freundo adjuvantas, o antrosios – nepilnas. Kitos imunizacijos atliktos baltymą skiedžiant PBS. Likus 4 dienoms iki hibridizacijos buvo atlikta sustiprinančiosios dozės (5 imunizacija) injekcija su baltymu ištirpintu PBS.

Makrofagai surinkti iš pelės pilvo ertmės plaunant 10 mL nesteruminės terpės. Makrofagai centrifuguojami 5 min 200 × g ir nupylus supernatantą suspenduojami 3 mL nesteruminės terpės. Hibridizacijai naudojami makrofagai laikomi stikliniuose buteliukuose, mielomų auginimui makrofagai išsėjami į flakonus.

Imunizuotos pelės blužnis steriliai išskirta ir 5 mL nesteruminės DMEM terpės smulkinta iki kol liks tik skaidri plėvelė. Terpėje likę blužnies fragmentai švelniai spenduojami iki kol homogenizuojasi terpė. Blužnies ląstelių suspensija surenkama ir prakošiama pro 100 µm filtrą į 50

mL mėgintuvėlį. Ląstelės centrifuguojamos 5 min $200 \times g$, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 10 mL niseruminės DMEM terpės. Ląstelės skaičiuojamos naudojant hemocitometrą *Bürker*.

2.3.4 Mielomos ląstelių auginimas

Sp2/0 mielomos ląstelių linija užsėjama mažiausiai savaitę prieš hibridizaciją. Atšildytos mielomos ląstelės išsėjamos į 1-3 75 cm² flakonus su prie paviršiaus prikibusiais makrofagais ir auginamos 20 mL augimo terpės tūryje. Priaugus ląstelių, mielomos persėjamos į 6-8 flakonus. Hibridizacijos dienai turi būti paruošti bent 6 mielomos ląstelių flakonai. Ląstelės surenkamos jas suspenduojant augimo terpėje, perkeliama į 50 mL plastikinius mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 5 min $200 \times g$. Nupylus supernatantą mielomos suskaičiuojamos naudojant hemocitometrą *Bürker*.

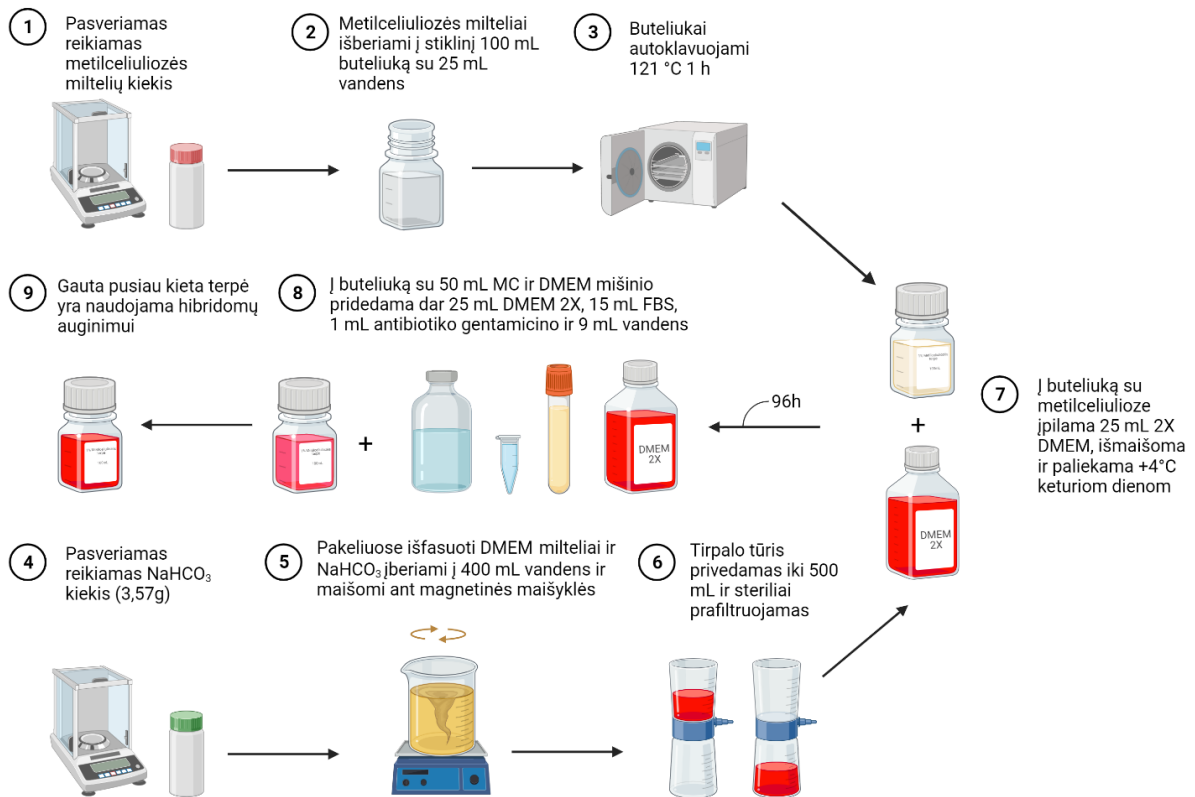
2.3.5 Mielomos ir blužnies ląstelių suliejimas, išsėjimas ir auginimas selektyvioje terpėje

Mielomos ir blužnies ląstelės yra suliejamos santykiu 1:5. Į mėgintuvėlį su terpėje suspenduotomis blužnies ląstelėmis įpilamas apskaičiuotas kiekis mielomos ląstelių. Ląstelės centrifuguojamos 7 min $200 \times g$, supernatantas nupilamas. Nusėdusios ląstelės atkeliamos nuo dugno švelniai daužant mėgintuvėlį į delną. 1 min bėgyje virš ląstelių sluoksnio tolygiai lašinamas 1 mL PEG-4000 reagento. Lašinant PEG-4000 mėgintuvėlis yra lėtai sukamas. Nustojus lašinti ląstelės 2 min inkubuojamos lėtai sukančiant mėgintuvėlį. Sekančias 2 min lėtai lašinama 10 mL DMEM terpės be serumo. Vėliau terpės pripilama iki 50 mL ir ląstelės centrifuguojamos 10 min $200 \times g$. Paruošiama hibridomų auginimo terpė su HAT, kurią sudaro surinkta mielomų auginimo terpės, FVS, 50 kartų koncentruotas HAT, surinkti makrofagai bei niseruminė DMEM terpė tūrio privedimui. Po centrifugavimo supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos su 5-10 mL paruošta HAT hibridomų terpe.

Po hibridizacijos ląstelės išsėjamos į 75 cm² flakonus su 15 % FVS DMEM terpe ir HAT bei auginamos 2 paras. Į 100 mL šviežiai paruoštos klampios terpės (2.3.6 skyrius) pilami 2 mL 50 kartų koncentruoto HAT. Paruošta klampi terpė su HAT kruopščiai išmaišoma suplakant buteliuką. Praėjus 2 parom, ląstelės iš flakonų surenkamos jas suspenduojant augimo terpėje ir centrifuguojant $200 \times g$. Apskaičiuotas kiekis ląstelių suleidžiamas į klampią terpę su HAT ir kruopščiai išmaišomas suplakant buteliukus. Naudojant sterilų švirkštą klampioje terpėje suspenduotos ląstelės išsėjamos į 6 šulinėlių plokšteles po 3 mL į šulinėlį. 5-12 dienų ląstelės auginamos inkubatoriuje 37 °C, 5 % CO₂.

2.3.6 Klampios terpės gamyba

Pasveriamas reikiamas kiekis metilceliuliozės miltelių ir suberiamas į stiklinį 100 mL buteliuką su 25 mL dejonizuoto vandens (**8 pav.**) – pvz., gaminant 1 % MC terpę suberiama 1 g MC miltelių. Buteliukai autoklavuojami 121 °C 1 h. Dukart koncentruoto DMEM tirpalo paruošimui naudojami pakeliuose išfasuoti DMEM milteliai. Visas pakelio turinys ir 3,57 g NaHCO₃ ištirpinami 400 mL dejonizuoto vandens. Gauto tirpalo pH privedamas iki 6,7-6,8, vandeniu tūris privedamas iki 500 mL. Paruoštas dukart koncentruotas DMEM tirpalas steriliai filtruojamas naudojant 0,2 µm porų filtrus. Į buteliuką su ištirpusia metilceliulioze įpilama 25 mL 2x DMEM tirpalo, išmaišoma suplakant buteliuką ir paliekama tirpti +4 °C 96 h. Praėjus keturiom parom į terpę pridedama dar 25 mL 2x DMEM, 15 mL veršiuko serumo (FVS), 1 mL 4 % antibiotiko gentamicino tirpalo ir 9 mL vandens. Buteliukas su paruošta terpe suplakamas ir 10 min paliekamas kambario temperatūroje, kol pakils burbuliukai.

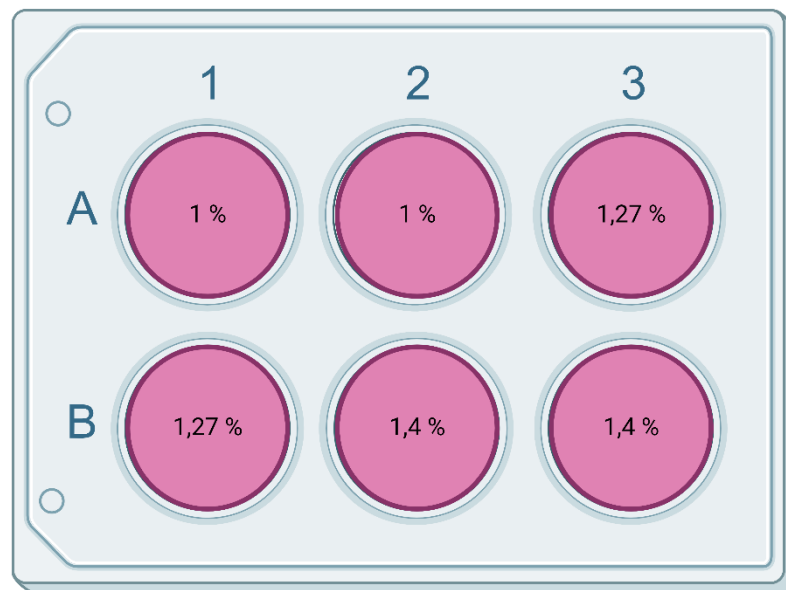


8 pav. Klampios terpės gamybos schema. Sukurta naudojant BioRender.com

2.3.7 Metilceliuliozės koncentracijos klampioje terpėje ir ląstelių sėjimo koncentracijos optimizavimas.

Metilceliuliozės koncentracijos optimizavimo tyrimui pagaminama trijų skirtingų MC koncentracijų terpė (1 %, 1,27 %, 1,4 %) kaip aprašyta 2.3.6. Ląstelių sėjimo koncentracijos optimizavimui naudojama tos pačios MC koncentracijos terpė (1 %). Paruošta klampioje terpėje atšildoma iki kambario temperatūros. Kiekvienai sėjimui naudojamai hibridomų linijai paruošiami šeši 5 mL plastikiniai mėgintuvėliai. Naudojant sterilius 5 mL švirkštus be adatos terpė po 3 mL fasuojama į 5 mL mėgintuvėlius. Kultivuojamos hibridomos (5H6, 12E12 ir 25E6) surenkamos iš flakonų, centrifuguojamos 5 min $200 \times g$ ir suspenduojamos 1 mL PBS. Ląstelės suskaičiuojamos pro mikroskopą naudojant hemocitometrą *Bürker*.

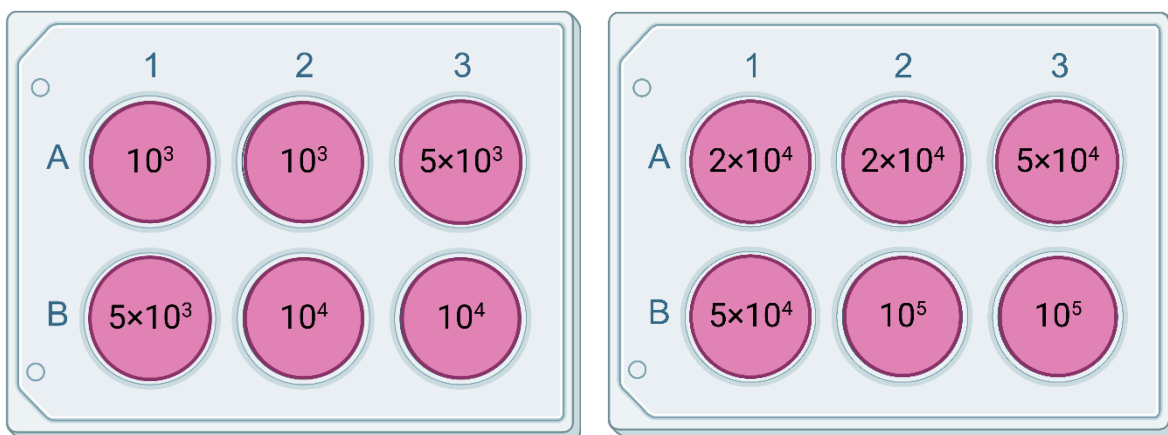
Optimizuojant klampios terpės MC koncentraciją, vienodas ląstelių kiekis (pvz, 2×10^4 ląst./šul.) įnešamas į kiekvieną mėgintuvėlį ir suspenduojamas terpėje. Mėgintuvėlis suplakamas kelis kartus. Terpėje pasiskirsčiusios ląstelės švirkštu iš mėgintuvėlio perkeliama ir užsėjamos į šešių šulinėlių plokšteles po 3 mL/šul. kaip parodyta schemoje (9 pav.).



9 pav. Sėjimo schema. Skaičiai šulinėlių centre nurodo metilceliuliozės koncentraciją klampioje terpėje. Sukurta naudojant *BioRender.com*

Optimizuojant ląstelių sėjimo koncentraciją kiekvienai ląstelių koncentracijai (10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 10^5 ląst./šul.) apskaičiuojamas reikiamas ląstelių suspensijos tūris sėjimui. Apskaičiuotas ląstelių kiekis suspenduojamas klampioje terpėje ir kruopščiai išmaišomas suplakant

mėgintuvėlių. Ląstelės išsėjamos į 6 šulinėlių plokšteles po 3 mL/šul. kaip parodyta schemoje (10 pav.).



10 pav. Sėjimo schema. Skaičiai šulinėlių centre nurodo ląstelių sėjimo koncentraciją (ląst./šul.). Sukurta naudojant *BioRender.com*

Kiekvienos hibridomų linijos ląstelės į klampią terpę sėjamos po du pakartojimus. Į plokštelės tarpus įpilama po 1 mL sterilaus dejonizuoto vandens. Plokštelės laikomos inkubatoriuje 37 °C ir nejudinamos mažiausiai 96 valandas. 7-tą, 10-tą ir 12-tą hibridomų augimo klampioje terpėje dieną plokštelės yra vizualizuojamos Clonepix 2 sistema.

2.3.8 Hibridomų klonų stebėjimas ir izoliavimas robotizuota klonų atrankos sistema Clonepix 2

7-tą, 10-tą ir 12-tą augimo dieną klampioje terpėje augančios ląstelės stebimos Clonepix 2 robotizuota sistema. Paleidžiama *Imaging Run* programa ir nustatomi programos parametrai. Į plokštelių laikiklį įstatomos visos plokštelės (≤ 10 plokštelių) su klampioje terpėje auginamomis ląstelėmis. Robotizuota sistema nufotografuoja kiekvieną šulinėlį, identifikuoja ląstelių klonus ir priskiria juos prie atitinkamos klonų grupės.

Prieš atliekant klonų izoliavimą autoklavuojamos klonų paėmimo adatėlės, žarnelės, adatėlių užsukimo raktelis ir 5 L butelis su 2-2,5 L dejonizuoto vandens. Mažiausiai prieš dvi valandas iki hibridomų klonų izoliavimo iš pelės peritoniumo steriliai surenkami makrofagai ir centrifuguojami 5 min $200 \times g$. Supernatantas nupilamas, o makrofagai suspenduojami DMEM terpėje su 15 % FVS ir gentamicinu bei išsėjami į 96 šul. plokšteles. Paleidus Clonepix 2 sistemą ir atlikus UV sterilinimą išimama klonų rinkimo galva, rakteliu atsukamos adatėlės ir nuimamos žarnelės. Roboto galva panardinama į 70 % etanolio tirpalą, steriliai ištraukiama laminarinėje traukos spintoje ir paliekama džioti mažiausiai 30 min. Steriliomis sąlygomis įsukamos autoklavuotos adatėlės ir užmaunamos

žarnelės. Paruošta klonų rinkimo galva steriliai pernešama ir įstatoma atgal į robotą. Paleidžiama *Prepare for Pick Run* programa. Sekant sistemos nurodymus užtikrinamas tolygus adatėlių judėjimas, sulygiuojama adatėlių ir kameros padėtis, 70 % etanolio tirpalu pripildoma adatėlių plovimo vonelė, sistema dezinfekuojama 70 % etanolio, UV ir praplaunama steriliu vandeniu. Atlikus sistemos paruošimo procedūrą paleidžiama *Pick Run* programa ir nustatomi parametrai. Į plokštelių laikiklį įstatomos visos plokštelės su klampioje terpėje auginamomis hibridomomis. Robotizuota sistema nufotografuoja kiekvieną šulinėlį, identifikuoja ląstelių klonus ir priskiria juos prie atitinkamos klonų grupės. Pasirenkamos klonų grupės, kurių izoliavimas bus atliekamas toliau. Į antrą plokštelių laikiklį įstatomos 96 šul. plokštelės su užsėtais makrofagais. Paleidžiama klonų izoliavimo programa, kurios metu sistema automatiškai perkelia ląstelių klonus iš 6 šulinėlių plokštelių į 96 šulinėlių plokšteles. Po klonų izoliavimo plokštelės dedamos į 37 °C CO₂ inkubatorių. Kelias dienas ląstelės auginamos 96 šul. plokštelėse iki kol dauguma izoliuotų klonų ląstelių užims mažiausiai 50 % šulinėlio ploto.

2.3.9 Netiesioginė imunofermentinė analizė (ELISA)

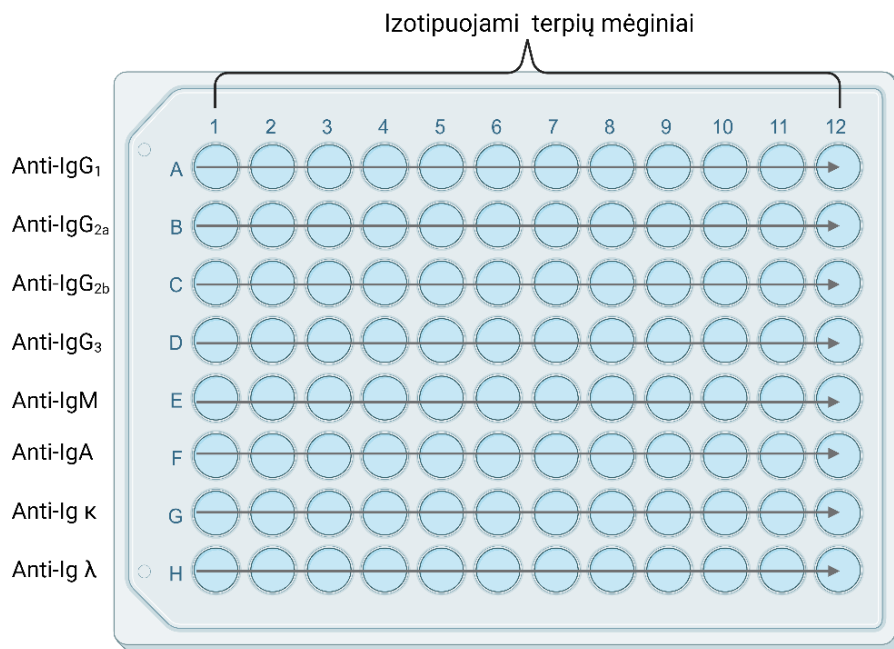
Hibridomų augimo terpės testavimui naudota netiesioginė ELISA. Jos metu yra nustatomi antigenui specifiški antikūnai, jeigu hibridomos juos sekretuoja.

96 šulinėlių Nunc MaxiSorp arba Nunc PolySorp plokštelėje imobilizuojamas 50 µL 1-5 µg/mL koncentracijos antigeno (rhBiP, Erp57, CNX arba CRT) tirpalas. Plokštelės inkubuojamos 4 °C per naktį. Kitą dieną plokštelės turinys nupilamas ir į šulinėlius išpilstoma po 300 µL blokavimo tirpalo (PBS su 2 % BSA). Plokštelės inkubuojamos 1 h kambario temperatūroje. Blokavimo tirpalas išpilamas, plokštelė praplaunama vandeniu. Steriliai surenkami hibridomų terpių mėginiai, išpilstomi į plokštelę po 50 µL ir inkubuojami 1 h kambario temperatūroje. Terpių mėginiai išpilami, plokštelė plaunama 4 kartus su 50:50 PBS-T:H₂O. Antriniai ožkos prieš pelės IgG antikūnai (Bio-Rad IgG(H+L)-HRP #1721011) skiedžiami 1:5000 PBS-T, po 50 µL išpilstomi į plokštelės šulinėlius ir inkubuojami 1 h kambario temperatūroje. Po inkubacijos antrinių antikūnų tirpalas išpilamas, plokštelė plaunama 4 kartus su 50:50 PBS-T:H₂O ir 2 kartus su H₂O. Į šulinėlius išpilstoma po 50 µL TMB (krienų peroksidazės substratas) ir laikoma tamsoje 3-15 min. Reakcija stabdoma su 25 µL 3,6 % H₂SO₄ tirpalo. Rezultatai vertinami spektrofotometriškai, matuojant sugertį ties 450 nm bangos ilgiu (palyginamasis bangos ilgis 620 nm).

2.3.10 Antikūnų klasių ir poklasių nustatymas

Tyrimui naudojamas *BD Pharmigen*TM izotipavimo rinkinys „Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit“. Kiekvienas žiurkės MAk specifinis pelės sunkiosioms IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM,

IgA, bei lengvosioms Ig κ , Ig grandinėms atskiedžiamas 50 kartų PBS. Kiekvieno antikūno tirpalas išpilstomas po 50 μ L eilutėmis kaip parodyta schemoje (**11 pav.**). Plokštelės inkubuojamos 4 °C pernakt arba 1 h 37 °C ant šildomos purtyklės. Po inkubacijos turinys išpilamas ir į plokštelę išpilstoma po 300 μ L blokavimo tirpalo bei inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Blokavimo tirpalas išpilamas, plokštelė plaunama vandeniu. Surinkti hibridomų terpių mėginiai po 50 μ L išpilstomi į plokštelę (jei būtina, terpių mėginiai skiedžiami PBS-T 3-5 kartus) (**11 pav.**).



11 pav. Izotipavimo schema. Sukurta naudojant *BioRender.com*

Plokštelė su mėginiais inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Terpių mėginiai išpilami, plokštelė plaunama 4 kartus su 1:1 PBS-T:H₂O. Antriniai antikūnai (HRP rat anti-mouse Ig) skiedžiami 1:200 PBS-T ir po 50 μ L išpilstomi į plokštelės šulinėlius. Plokštelė inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Po inkubacijos plokštelė ryškinama analogiškai kaip aprašyta 2.3.12.

2.3.11 Statistinė duomenų analizė

Duomenų analizė atlikta GraphPad Prism 10.2.2 programa. Rezultatai įvertinti pasitelkus aprašomąją statistiką apskaičiuojant medianą $\pm$ tarpkvartilinis plotis (IQR). Tyrimų duomenims palyginti taikyti Kruskal-Wallis ir Mann-Whitney testai ($p < 0,05$). ELISA ribinė vertė apskaičiuota pagal neigiamos kontrolės vidurkį + 3 standartiniai nuokrypiai (SD).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šio darbo tikslas buvo sukurti ir optimizuoti klampios terpės metilceliuliozės (MC) pagrindu gamybos protokolą. Tuo buvo siekiama pasiūlyti hibridomų atrankos ir klonavimo būdą, leidžiantį sutaupyti darbo laiko bei finansinių resursų reagentams. Be to, produktyvus monokloninių populiacijų izoliavimo metodas leistų greitai ir tiksliai identifikuoti tikslinį baltymą gaminančius ląstelių klonus. Sėjant hibridomas į klampią terpę buvo siekiama nustatyti augimui ir klonų formavimuisi optimalią MC koncentraciją bei ląstelių koncentraciją sėjimui, kad būtų galima tikėtis vienodo skirtingų hibridomų linijų augimo greičio ir susidariusių klonų skaičiaus. Tai leistų hibridomų klonavimui klampioje terpėje pateikti rekomenduojamą terpės gamybos protokolą ir ląstelių sėjimo koncentraciją, todėl labai svarbu optimizuoti sėjimo sąlygas stebint skirtingų hibridomų linijų augimo rezultatus. Taip pat šio darbo metu buvo vertinamas hibridizuotų ląstelių augimas klampioje terpėje su HAT atrankos sistemos komponentais. Tuo buvo siekiama apjungti hibridomų atranką ir klonavimą į vieną proceso žingsnį.

3.1 Metilceliuliozės koncentracijos klampioje terpėje optimizavimas

Klampios terpės gamybai buvo panaudota standartinė DMEM terpė, kurios sudėtyje yra ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui palaikyti būtinos maisto medžiagos ir aminorūgštys. Kaip klampios terpės pagrindas buvo panaudota MC – ląstelėms netoksiškas sintetinis polimeras, suteikiantis augimo terpei klampumo. MC tarnauja kaip fizinis barjeras, todėl ląstelės auga atskirai viena nuo kitos ir yra linkusios formuoti monoklonines populiacijas (Freedman, 1974), kurias patogiu izoliuoti rankiniu būdu ir robotizuota ląstelių klonų atrankos sistema.

Optimizuojant klampią terpę hibridomų auginimui ir klonavimui, būtina nustatyti optimalią MC koncentraciją terpės gamybai. Dėl MC savybės suteikti augimo terpei klampumo, suspensinės ląstelės gali būti imobilizuojamos terpėje. Tai lemia klonų augimą iš pavienių ląstelių ir užtikrina jų stabilų padėtį terpėje. Nors MC yra netoksiška ląstelėms, didelis MC kiekis terpėje gali daryti neigiamą įtaką ląstelių augimui bei klonų formavimuisi, inhibuojant tarpląstelines sąveikas, maisto medžiagų ir augimo veiksmų prieinamumą ląstelėms (Ito et al., 1987). Tuo tarpu esant mažai MC koncentracijai terpėje, ląstelės silpnai imobilizuojamos, kas lemia jų maišymąsi ir heterogeniškų populiacijų augimą. Taigi, buvo iškelta hipotezė, kad stabilų hibridomų linijų 5H6, 12E12 ir 25E6 augimas bei klonų formavimas priklauso nuo MC koncentracijos terpėje.

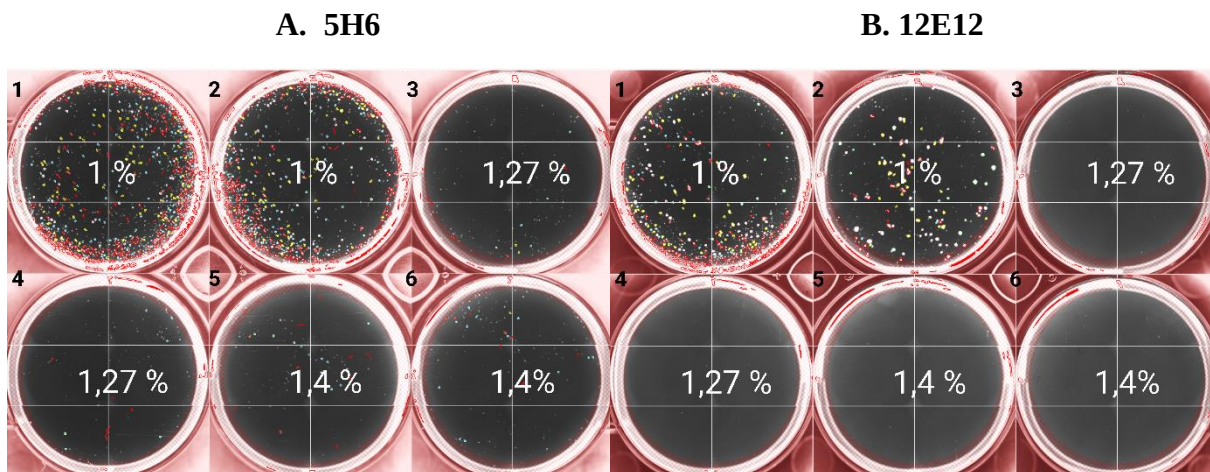
3.1.1 Hibridomų augimas skirtingos MC koncentracijos terpėse

Vadovaujantis terpės gamybos schema (8 pav.) buvo pagamintos 0,6 %, 0,8 %, 1 %, 1,27 %, 1,4 % ir 1,6 % MC koncentracijos klampios terpės. 0,6 % ir 0,8 % MC terpės yra pernelyg skystos ir nesukietėja prie 37 °C, todėl buvo atmestos. Tuo tarpu aukštesnės nei 1,4 % MC koncentracijos terpės prastai tirpsta ir yra sunkiai homogenizuojamos. Dėl šių priežasčių ląstelių augimo palyginimui buvo naudojamos 1 %, 1,27 % ir 1,4 % MC terpės.

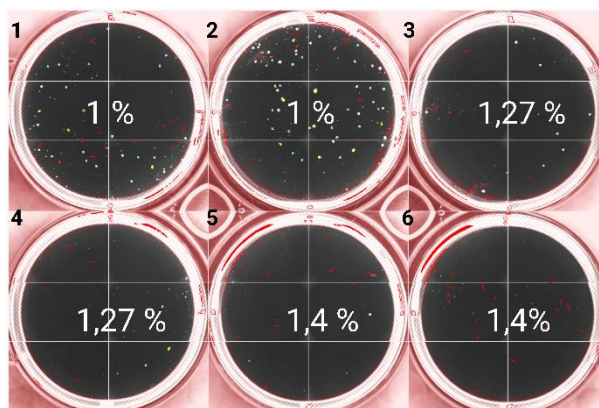
Hibridomų 5H6, 12E12 ir 25E6 linijos ta pačia ląstelių koncentracija (2×10^4 ląstelių šulinėlyje (ląst./šul.)) buvo sėjamos į paruoštas 1 %, 1,27 % ir 1,4 % MC terpes po 2 pakartojimus. Ląstelės išsėtos į 6 šulinėlių plokšteles po 3 mL/šul. 4-tą, 7-tą, 10-tą ir 12-tą augimo dieną ląstelės stebėtos mikroskopuojant, o priaugus klonų – fotografuotos Clonepix 2 sistema (12 pav.).

Visus detektuotus klonus Clonepix 2 sistema skirsto į 6 grupes:

1. „Tinkami“ klonai (žalia spalva) – taisyklingos apvalios formos ir didesnio nei 0,1 mm² ploto klonai;
2. „Per arti augantys“ klonai (rožinė spalva) – klonai, lokalizuoti mažesniu nei 1 mm atstumu nuo kito klonų;
3. „Netaisyklingos formos“ klonai (geltona spalva) – neapvalūs ir neproporcingi klonai;
4. „Per maži“ klonai (mėlyna spalva) – klonai, kurių plotas mažesnis nei 0,1 mm²;
5. „Per dideli“ klonai (violetinė spalva) – klonai, kurių neapima roboto adatėlė (angl. *picking pin*);
6. „Per arti šulinėlio krašto augantys“ klonai (raudona spalva) – sistemai fiziškai neprieinami klonai.



C. 25E6



12 pav. Stabilių hibridomų linijų augimas skirtingos MC koncentracijos klampioje terpėje. Skirtingų hibridomų linijų rezultatai pateikti: A – 5H6, B – 12E12, C – 25E6. A1-A2, B1-B2 ir C1-C2 šulinėliuose terpės MC koncentracija 1 %; A3-A4, B3-B4 ir C3-C4 – 1,27 %; A5-A6, B5-B6 ir C5-C6 – 1,4 %. Skirtingos spalvos taškai žymi užaugusių klonų atitikimą klonų grupėms. Šulinėlių viduryje nurodyta MC koncentracija. Nuotraukos darytos Clonepix 2 sistema 12-tą augimo dieną.

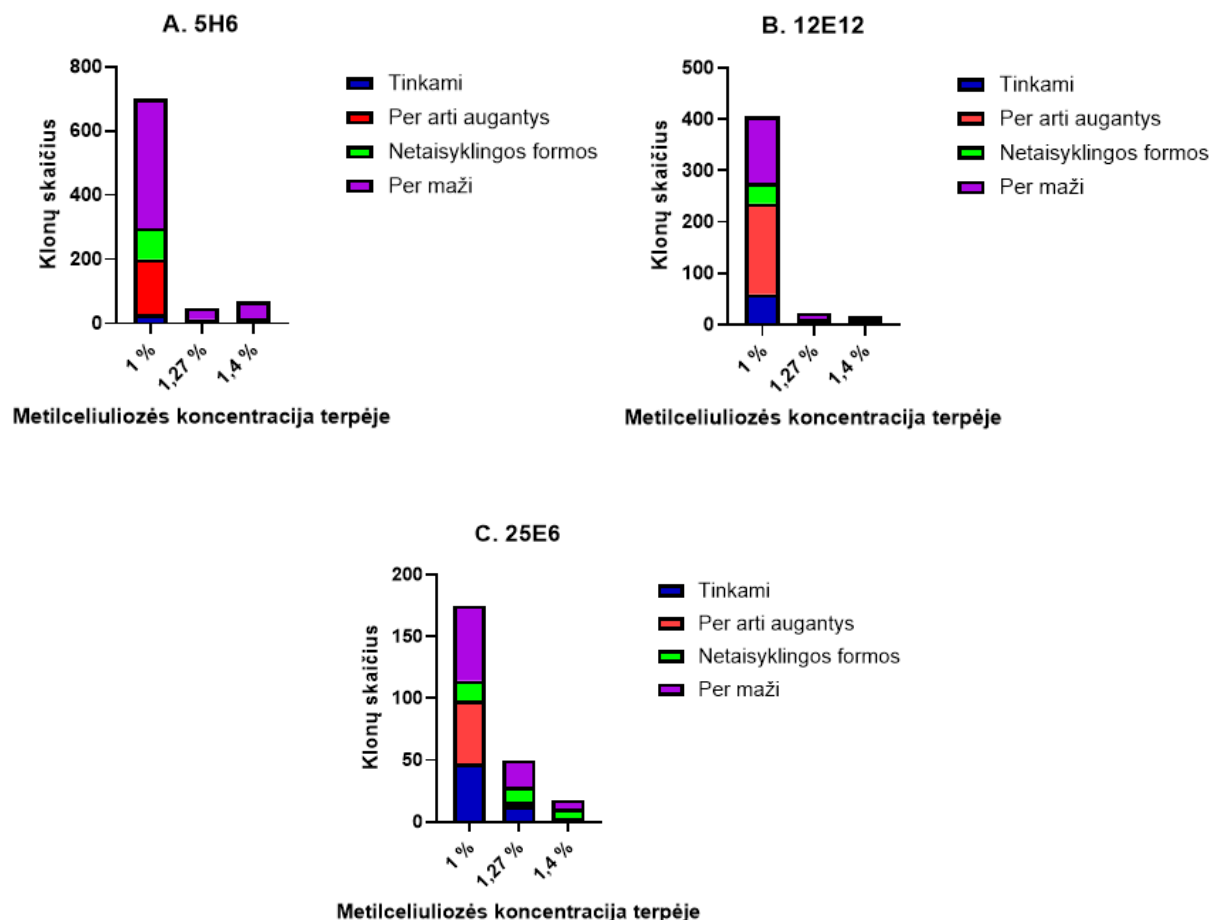
Atlikus hibridomų 5H6, 12E12 ir 25E6 linijų sėjimus buvo nustatyta, kad vertinant vizualiai daugiausiai klonų susidaro ląsteles auginant 1 % MC terpėje (**12 pav.**). 1,27 % ir 1,4 % MC terpėje ląstelės auga žymiai prasčiau. Šių MC koncentracijų terpėse 5H6 ir 25E6 hibridomos auga ir formuoja klonus, tačiau jų yra žymiai mažiau lyginant su 1 % MC terpėje užaugusių klonų kiekiu. Tuo tarpu 12E12 hibridomos 1,27 % ir 1,4 % MC terpėse auga labai prastai.

3.1.2 Užaugusių hibridomų klonų kokybės analizė

Klonų izoliavimo etape įprastai pasirenkami tik “tinkamų” kategorijai priskirti klonai, kurių dažniausiai nėra daug. Norint izoliuoti daugiau ląstelių paimami „per arti augančių“ kategorijai priskirti klonai. Izoliuojant šiuos klonus didėja greta esančių klonų paėmimo tikimybė – tai daro neigiamą įtaką ląstelių populiacijų monokloniškumo išlaikymui, tačiau vykdant papildomą klonavimą tikimybė izoliuoti monoklonus padidėja. Visos kitos klonų kategorijos nėra pageidaujamos ir įprastai neizoliuojamos.

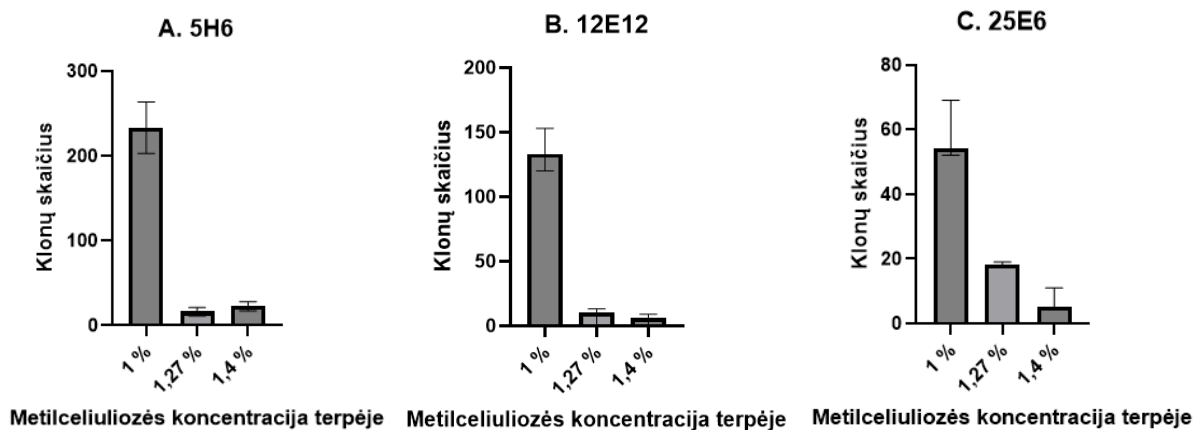
Šio tyrimo metu buvo svarbu nustatyti, kuri MC koncentracija terpėje suteiks reikiamą klampumo lygį ir sukurs palankiausias sąlygas hibridomų augimui ir klonų formavimuisi. Atlikus tris hibridomų sėjimus skirtingose MC koncentracijos terpėse buvo pastebėta, kad dauguma klonų priklausė „tinkamų“, „per arti augančių“, „netaisyklingos formos“ ir „per mažų“ klonų kategorijoms, todėl

analizei buvo panaudoti tik šių 4 klonų grupių duomenys. Grafiškai pateikti apjungti trijų sėjimų rezultatai (**13 pav.**).



13 pav. Hibridomų klonų pasiskirstymas į grupes ląsteles auginant skirtingos MC koncentracijos terpėse. Skirtingų hibridomų linijų rezultatai pateikti: A – 5H6, B – 12E12, C – 25E6. Skirtingos spalvos stulpelio dalys žymi skirtingas klonų grupes.

Pagal **13 pav.** pateiktus rezultatus matyti, kad visų 4 kategorijų, tame tarpe ir „tinkamų“, klonų daugiausiai užauga 1 % MC terpėje. Tai patvirtina „tinkamų“ ir „per arti augančių“ klonų skaičiaus medianos, apskaičiuotos iš 3 sėjimų rezultatų (**14 pav.**). Taigi 1 % MC klampi terpė atrodo optimaliausias pasirinkimas.



14 pav. „Tinkamų“ ir „per arti augančių“ 5H6, 12E12 ir 25E6 hibridomų klonų skaičiaus palyginimai tarp skirtingos MC koncentracijos terpių. A – 5H6, B – 12E12, C – 25E6. Klonų skaičiaus medianos apskaičiuotos iš 3 sėjimo pakartojimų, paklaidos pateiktos kaip tarpkvartilinis plotis. Duomenims palyginti taikytas Kruskall-Wallis testas. A – $p = 0,0143$, B – $p = 0,0286$, C – $p = 0,0036$.

Trijų sėjimų rezultatai rodo, kad visose 5H6, 12E12 ir 25E6 hibridomų linijose izoliavimui pasirenkamų („tinkamų“ ir „per arti augančių“) klonų daugiausiai užauga 1 % MC terpėje (**14 pav.**). 1,27 % ir 1,4 % MC terpėse užaugusių klonų skaičius neviršijo 20 klonų, kuomet 1 % MC terpėje jų kiekis varijavo nuo 50 iki 250 klonų. Lyginant su 1 % MC terpe, 1,27 % ir 1,4 % MC terpių klampumo lygis yra pernelyg aukštas, kas tikėtina lemia sulėtėjusią maisto medžiagų, augimo veiksmų ir deguonies difuziją terpėje. Giliau terpėje lokalizuotos ląstelės negauna reikiamo šių medžiagų kiekio, kas neigiamai veikia klonų augimo greitį ir gyvybingumą. Be to, didėjant MC koncentracijai terpėje, didėja pasipriešinimas klonų augimui dėl klampios terpės mechaninių savybių. Dėl šios priežasties klonai neauga dideli ir galiausiai žūsta. Šis tyrimas patvirtino hipotezę, kad hibridomų augimas ir klonų formavimasis priklauso nuo MC koncentracijos terpėje. Taigi, atlikus hibridomų sėjimus į skirtingos MC koncentracijos terpes, buvo nustatyta optimali 1 % MC koncentracija klampios terpės gamybai.

3.2 Optimalios hibridomų koncentracijos sėjimui klampioje terpėje nustatymas

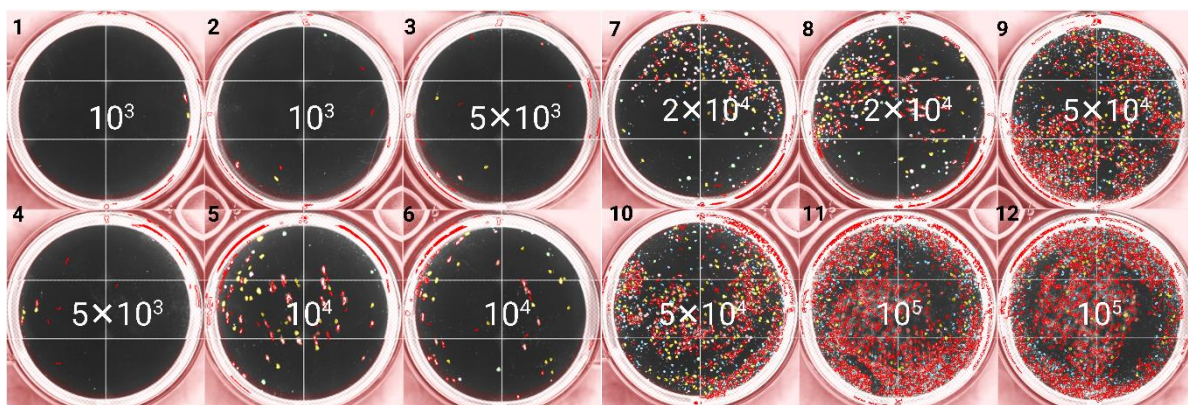
Optimizuojant klampią terpę ir hibridomų auginimo sąlygas joje, būtina nustatyti optimalią ląstelių koncentraciją sėjimui. Šiame etape svarbu užtikrinti, kad ląstelės pakankamai greitai proliferuotų, išliktų gyvybingos, neperaugtų ir formuotų apvalios formos monoklonines populiacijas.

Taip pat svarbu, kad klonai užaugtų > 1 mm atstumu vienas nuo kito, kad Clonepix 2 sistema priskirtų juos „tinkamų“ klonų kategorijai. Esant > 1 mm atstumui tarp klonų, paėmimo metu garantuotai nebus ištraukti greta esantys klonai, kas užtikrins monokloniškumą. Taigi, buvo iškelta hipotezė, kad stabilių hibridomų linijų 5H6, 12E12 ir 25E6 gebėjimas klampioje terpėje formuoti apvalios formos klonus, augančius > 1 mm atstumu vienas nuo kito, tiesiogiai priklauso nuo užsėtų ląstelių skaičiaus.

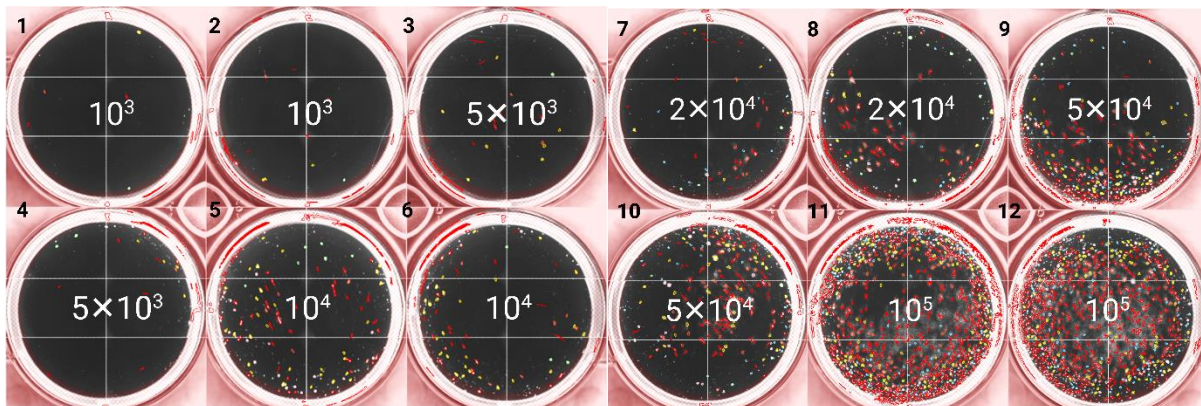
3.2.1 Hibridomų augimas klampioje terpėje sėjant skirtingas ląstelių koncentracijas

Norint nustatyti, kuri ląstelių koncentracija yra optimaliausia sėjimui, ląstelės buvo sėjamos į 1 % MC terpę (3 mL/šul.) skirtingomis sėjimo koncentracijomis (10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 ir 10^5 ląstelių šulinėlyje (ląst./šul.)). Clonepix 2 robotu plokštelės fotografuotos 12-tą augimo dieną (15 pav.).

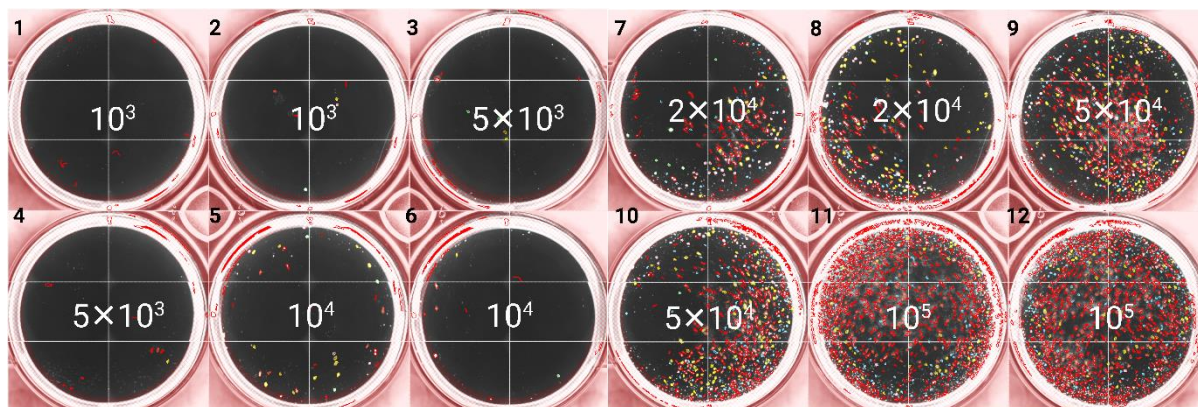
A. 5H6



B. 12E12



C. 25E6



15 pav. Stabilių hibridomų linijų augimas klampioje terpėje užsėjant skirtingas ląstelių koncentracijas. Skirtingų hibridomų linijų rezultatai pateikti: A – 5H6, B – 12E12, C – 25E6. A1-A6, B1-B6 ir C1-C6 šulinėliuose užsėtos ląstelių koncentracijos intervalas $10^3 - 10^4$ ląst./šul.; A7-A12, B7-B12 ir C7-C12 – $2 \times 10^4 - 10^5$ ląst./šul. Skirtingos spalvos taškai žymi užaugusių klonų atitikimą klonų grupėms. Šulinėlių viduryje nurodytos ląstelių koncentracijos užsėjant. Nuotraukos darytos Clonepix 2 sistema 12-tą augimo dieną.

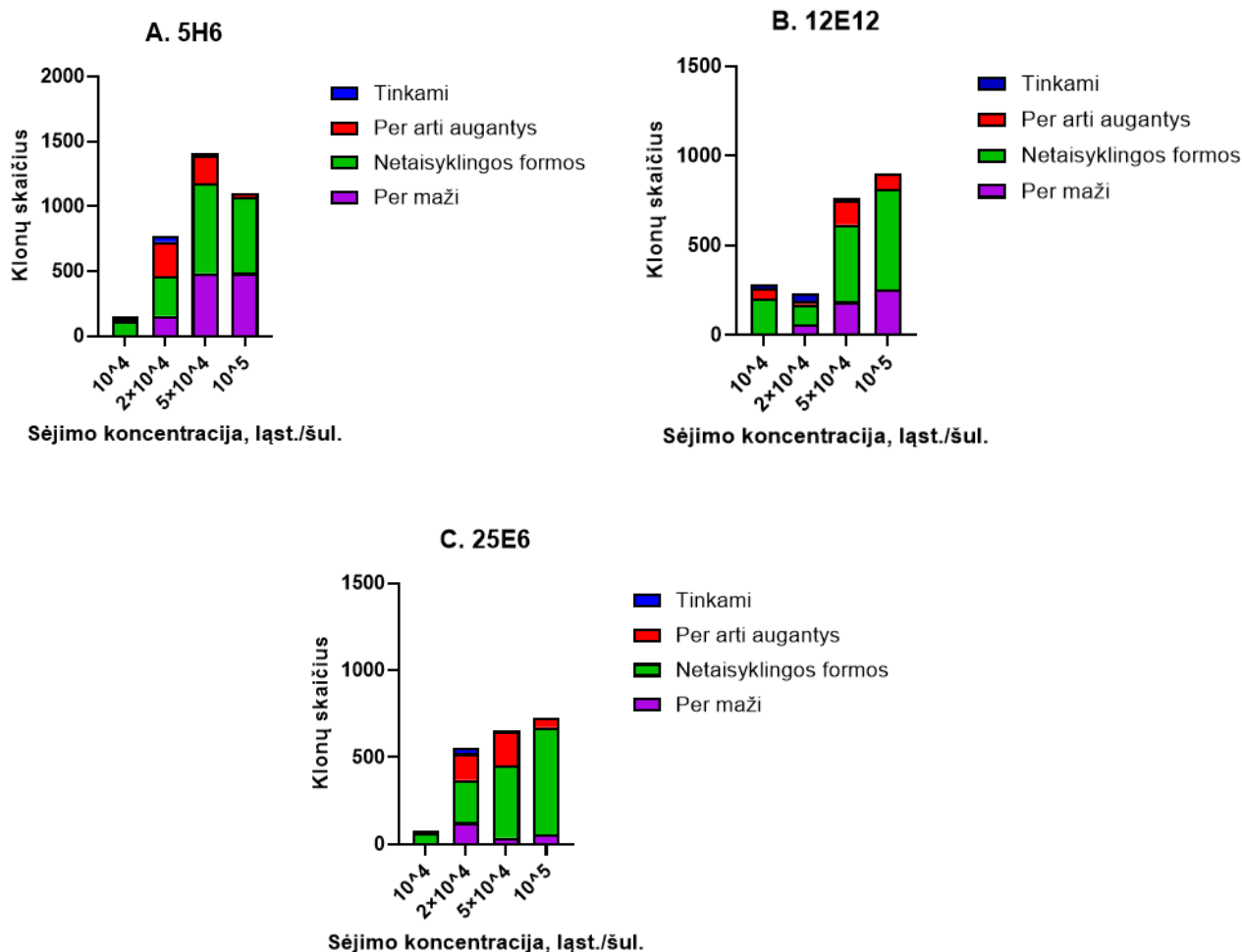
Atlikus trijų hibridomų linijų sėjimus buvo nustatyta, kad vertinant vizualiai daugiausiai klonų užauga ląsteles sėjant 10^5 ląst./šul., tuo tarpu daugiausiai „tinkamų“ klonų užauga sėjant 2×10^4 ląst./šul. (**15 pav.**). Ląsteles sėjant 10^3 ir 5×10^3 ląst./šul. klonų susidaro mažai (< 10), o dauguma jų buvo priskirti „netaisyklingos formos“ klonų kategorijai. Klampioje terpėje klonuojant hibridomas siekama izoliuoti kuo daugiau „tinkamų“ kategorijai priskirtų klonų. Ląsteles sėjant 10^3 ir 5×10^3 ląst./šul. „tinkamų“ klonų skaičius buvo labai mažas (0-3 „tinkami“ klonai), todėl šios dvi sėjimo koncentracijos buvo atmestos. Ląsteles sėjant 10^4 ir 2×10^4 ląst./šul. „tinkamų“ klonų užauga daugiau (5-20 „tinkamų“ klonų) lyginant su 10^3 ir 5×10^3 ląst./šul. Sėjant 5×10^4 ir 10^5 ląst./šul. ląstelės perauga – klonų susidaro labai daug ir jie auga labai arti vienas kito, todėl paėmimo etape padidėja kelių klonų izoliavimo tikimybė, kas daro neigiamą įtaką monokloniškumo išlaikymui. Dėl šių priežasčių galima teigti, kad 10^4 ir 2×10^4 ląst./šul. yra optimaliausios koncentracijos hibridomų sėjimui į 1 % MC klampią terpę, tačiau tam patvirtinti reikia įvertinti užaugusių klonų kokybę.

3.2.2 Užaugusių hibridomų klonų kokybės analizė

3.2.2.1 Užaugusių hibridomų klonų kategorijų palyginimas

Hibridomų 5H6, 12E12, 25E6 sėjimai buvo kartojami 3 kartus. 12-tą augimo dieną klampioje terpėje augančios ląstelės buvo fotografuojamos Clonepix 2 sistema, kuri išanalizuoja kiekvieną kloną ir priskiria jį prie tam tikros kategorijos. Remiantis Clonepix 2 sugeneruotais duomenimis buvo

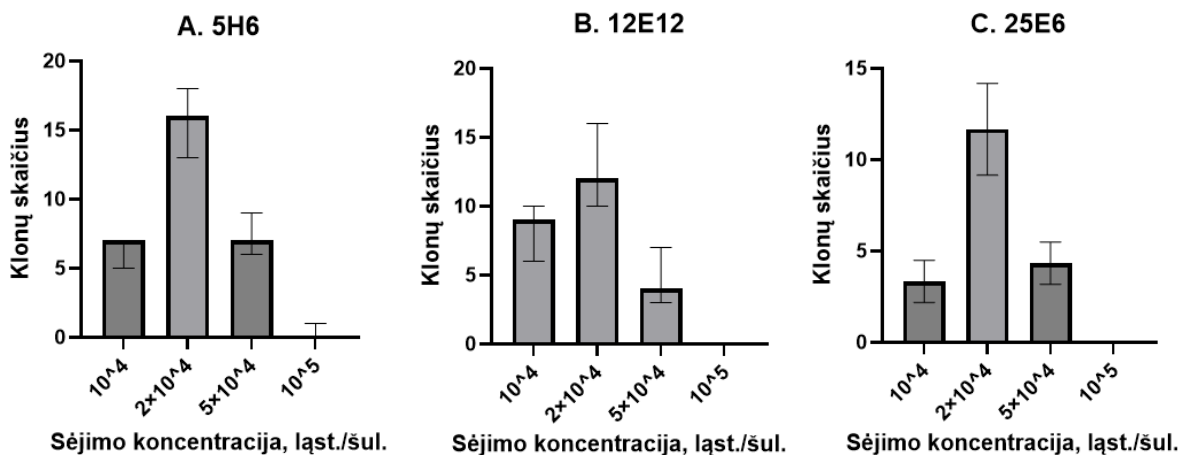
analizuojami 4-ių sėjimo koncentracijų (10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 ir 10^5 ląst./šul.) rezultatai (**16 pav.**). Analizei panaudoti 4 klonų kategorijų („tinkami“, „per arti augantys“, „netaisyklingos formos ir „per maži“) duomenys (**16 pav.**). Nustatant optimalią ląstelių sėjimo koncentraciją, svarbiausia atsižvelgti į „tinkamų“ bei „per arti augančių“ klonų kiekį. „Per arti augančius“ klonus galima pakartotinai klonuoti ir taip gauti monoklonines populiacijas. Todėl svarbiausia yra nustatyti, kuriame ląstelių sėjimo koncentracijų intervale šių grupių klonų yra daugiausia.



16 pav. Hibridomų klonų pasiskirstymas į grupes sėjant skirtingus ląstelių kiekius. Skirtingų hibridomų linijų rezultatai pateikti: A – 5H6, B – 12E12, C – 25E6. Skirtingos spalvos stulpelio dalys žymi skirtingas klonų grupes.

Daugiausiai „tinkamų“ klonų užauga ląsteles sėjant 2×10^4 ląst./šul. (5H6 – 16 ± 3 , 12E12 – 12 ± 4 , 25E6 – 12 ± 2 „tinkamų“ klonų) (**17 pav.**), o daugiausiai „per arti augančių“ klonų užauga ląsteles sėjant 2×10^4 ląst./šul. (5H6 – 88 ± 21 , 12E12 – 7 ± 4 , 25E6 – 50 ± 9 „per arti augančių“ klonų) ir 5×10^4 ląst./šul. (5H6 – 72 ± 29 , 12E12 – 45 ± 28 , 25E6 – 62 ± 19 „per arti augančių“ klonų) (**16**

pav.). Taip pat buvo pastebėta, kad „tinkamų“ klonų skaičius sumažėja ląsteles sėjant 5×10^4 ($A - 7 \pm 2$, $B - 4 \pm 3$, $C - 4 \pm 2$ „tinkamų“ klonų) ir 10^5 ląst./šul. (A , B ir $C - 0 \pm 1$, „tinkamų“ klonų) (**17 pav.**), o didžiąją dalį klonų sudaro „netaisyklingos formos“ ir „per maži“ klonai (**16 pav.**). Įprastai, šios dvi grupės nėra aktualios klonuojant hibridomas, todėl taip pat svarbu parinkti tokią ląstelių sėjimo koncentraciją, kurioje „netaisyklingos formos“ ir „per mažų“ klonų bus mažiausiai. Kaip rodo trijų stabilių hibridomų linijų rezultatai, daugiausia „tinkamų“ (**17 pav.**) ir mažiausiai „netaisyklingos formos“ bei „per mažų“ klonų (**16 pav.**) yra gaunama sėjant ląsteles 10^4 ir 2×10^4 ląst./šul.

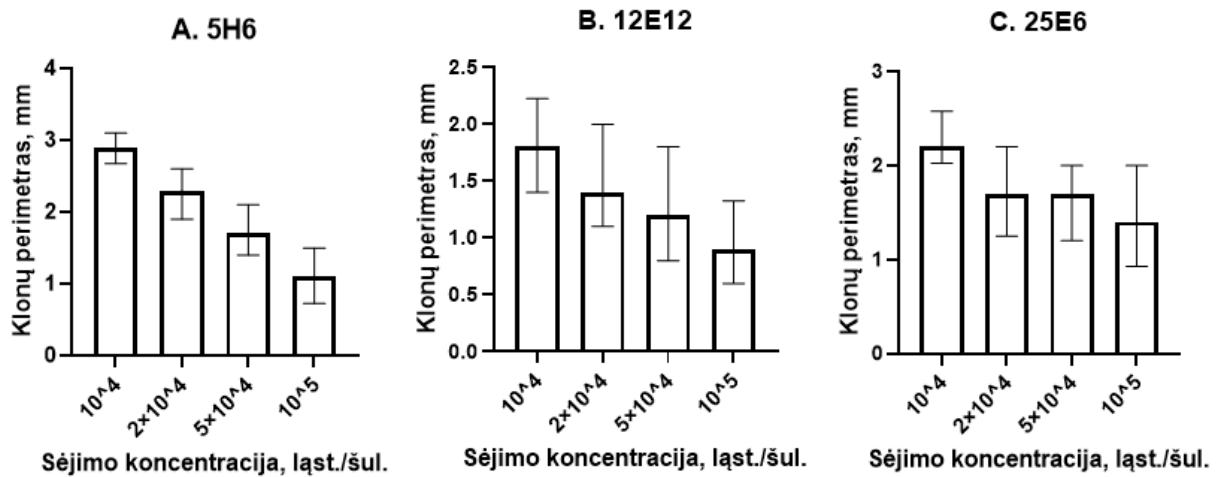


17 pav. Užaugusių „tinkamų“ 5H6, 12E12 ir 25E6 hibridomų klonų kiekio skirtumai tarp ląstelių sėjimo koncentracijų. Skirtingų hibridomų linijų rezultatai pateikti: $A - 5H6$, $B - 12E12$, $C - 25E6$. Klonų skaičiaus medianos apskaičiuotos iš 3 sėjimo pakartojimų, paklaidos pateiktos kaip tarpkvartilinis plotis. Duomenims palyginti taikytas Kruskall-Wallis testas. $A - p = 0,0008$, $B - p = 0,0003$, $C - p = 0,0002$.

Tikėtina, kad ląsteles sėjant 2×10^4 ląst./šul. „tinkamų“ klonų susidaro daugiau lyginant su žemesnėmis (10^3 - 10^4 ląst./šul.) koncentracijomis, kadangi sėjant daugiau ląstelių padidėja tikimybė, kad tarp jų bus daugiau proliferauti ir formuoti klonus gebančių ląstelių. Be to, ląsteles sėjant tankiau, padidėja tarpląstelinis sąveikų kiekis, kuris turi tiesioginę įtaką klonų formavimuisi. Tuo tarpu ląsteles sėjant 5×10^4 ir 10^5 ląst./šul. „tinkamų“ klonų susidaro mažiau lyginant su 2×10^4 ląst./šul., kadangi ląsteles užsėjus pernelyg tankiai, padidėja konkurencija dėl maisto medžiagų, augimo veiksnių ir klonų augimo erdvės. Šie veiksniai inhibuoja ląstelių proliferaciją ir klonų augimą.

3.2.2.2 Užaugusių hibridomų klonų dydžių palyginimas

Nustatant optimalią ląstelių sėjimo koncentraciją, svarbu atsižvelgti ir į užaugusių klonų dydį. Kuo klonas didesnis, tuo jame daugiau ląstelių, todėl tikėtina, kad po izoliavimo daugiau ląstelių išliks gyvybingos ir proliferuos. Buvo analizuojami Clonepix 2 programinės įrangos išmatuoti klonų perimetro duomenys, kurių medianos apskaičiuotos iš 3 sėjimų rezultatų (18 pav.).



18 pav. Užaugusių „tinkamų“ ir „per arti augančių“ 5H6, 12E12 ir 25E6 hibridomų klonų perimetro skirtumai tarp ląstelių sėjimo koncentracijų. Skirtingų hibridomų linijų rezultatai pateikti: A – 5H6, B – 12E12, C – 25E6. Klonų perimetro medianos apskaičiuotos iš 3 sėjimų pakartojimų, paklaidos pateiktos kaip tarpkvartilinis plotis. Duomenims palyginti taikytas Mann-Whitney U testas. A, B ir C – $p < 0,0001$.

Remiantis gautais rezultatais, galima teigti, kad didėjant ląstelių sėjimo koncentracijai, mažėja vidutinis klonų perimetras, tuo pačiu ir bendras klonų dydis. Pagal perimetrą didžiausi klonai užauga ląsteles sėjant 10^4 ląst./šul. (5H6 – $2,9 \pm 0,2$ mm, 12E12 – $1,8 \text{ mm} \pm 0,5$ mm, 25E6 – $2,2 \text{ mm} \pm 0,4$ mm), mažiausi – 10^5 ląst./šul. (5H6 – $1,0 \text{ mm} \pm 0,5$ mm, 12E12 – $0,9 \text{ mm} \pm 0,5$ mm, 25E6 – $1,4 \text{ mm} \pm 0,5$ mm). Tikėtinos to priežastys – ląstelių konkurencija dėl maisto medžiagų ir dėl aukšto ląstelių tankio susidarantis didelis metabolinių produktų kiekis augimo terpėje. Šie du procesai sulėtina ląstelių augimą, todėl esant aukštam ląstelių tankiui ($> 5 \times 10^4$ ląst./šul.) klonai būna mažesni ir trumpiau išlieka gyvybingi, lyginant su žemesnėmis ląstelių koncentracijomis. Be to, terpėje esant mažiau ląstelių, jos turi daugiau erdvės proliferuoti, todėl klonai užauga didesni.

Į klampią terpę sėjant skirtingus kiekius ląstelių, susidariusių klonų kokybė ir dydis labai varijuoja. Šių tyrimų metu buvo patvirtinta hipotezė, kad hibridomų gebėjimas klampioje terpėje formuoti apvalios formos klonus, augančius > 1 mm atstumu vienas nuo kito, tiesiogiai priklauso nuo užsėtų ląstelių skaičiaus. Taigi, nustatant optimalią ląstelių sėjimo koncentraciją klampioje terpėje

buvo pasirinktas koncentracijos intervalas $10^4 - 2 \times 10^4$ ląst./šul. Sėjant ląsteles 10^4 ląst./šul., formuojasi didesni klonai, tačiau jų yra mažiau lyginant su 2×10^4 ląst./šul. Norint izoliuoti kuo daugiau „tinkamų“ klonų patartina ląsteles sėti 2×10^4 ląst./šul. Kai kurios hibridomų linijos labai greitai proliferuoja, tuo tarpu kitos linijos auga pasyviau. Užsėjus hibridomas, svarbu reguliariai stebėti jų augimą ir laiku izoliuoti užaugusius klonus.

3.3 Ląstelių auginimas hibridomoms selektyvioje klampioje terpėje

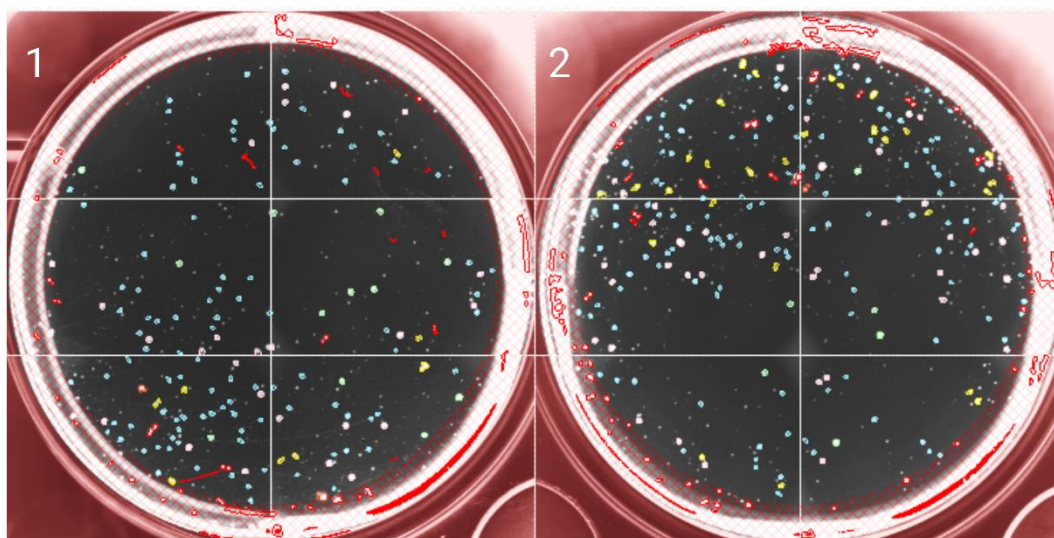
3.3.1 Ląstelių hibridizacija ir išsėjimas

Iš kalneksinu (CNX) imunizuotos BALB/c linijos pelės išskirtos blužnies ląstelės buvo sulietos su Sp2/0 vėžinėmis mielomos ląstelėmis santykiu 5:1. 83 mln. ląstelių buvo išsėtos į 75 cm² flakonus po 10,3 mln. ląstelių į flakoną ir augintos HAT terpėje 48 h. Ląstelės buvo paaugintos flakonuose su HAT terpe tam, kad jos atsigautų po suliejimo ir į klampią terpę būtų išsėta daugiau sulietų ląstelių (hibridomų) ir mažiau mielomos ląstelių. Po dviejų parų ląstelės iš flakonų buvo surinktos, suskaičiuotos, suspenduotos šviežiai paruoštoje 1 % MC klampioje terpėje su HAT atrankos sistemos komponentais ir išsėtos po 3 mL/šul. į 6 šulinėlių plokšteles. Ląstelės išsėtos 2×10^4 ląst./šul. tankiu į 7 plokšteles.

3.3.2 Užaugusių klonų izoliavimas, testavimas ir reklonavimas

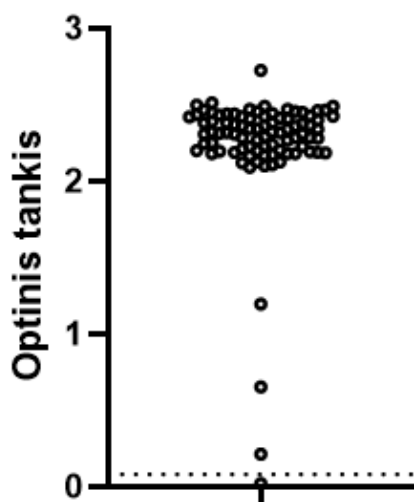
Iš klampios terpės buvo tikimasi izoliuoti kuo daugiau gyvybingų hibridomų klonų, todėl jau 7-tą ląstelių augimo dieną buvo vykdomas klonų vizualizavimas ir izoliavimas. Iš 7 plokštelių buvo izoliuota 413 hibridomų klonų priklausančių „tinkamų“ ir „per arti augančių“ klonų kategorijoms. Klonai buvo perkelti į 96 šulinėlių plokšteles su 9 % FVS DMEM terpe ir makrofagais.

5-tą dieną po klonų izoliavimo buvo testuojamos hibridomų terpės netiesiogine ELISA. Iš 5-ių plokštelių buvo identifikuotas vos 1 teigiamas klonas (OT = 1,78), kuomet visų likusių klonų OT < 0,20 (teigiamos kontrolės OT = 2,29). Klonui buvo priskirtas identifikacinis pavadinimas – „3H3“. Hibridomos 3H3 ląstelės buvo suspenduotos augimo terpėje, suskaičiuotos ir 2×10^4 ląst./šul. išsėtos į 1 % MC klampią terpę be HAT po 3 mL/šul. 12-tą dieną ląstelės fotografuotos Clonepix 2 robotizuota sistema (**19 pav.**).



19 pav. Hibridomos 3H3 reklonų klampioje terpėje nuotrauka. Nuotrauka daryta Clonepix 2 sistema 12-tą augimo dieną.

Hibridomos 3H3 reklonų vizualizavimas ir izoliavimas atliktas 12-tą augimo dieną. Didžioji dalis užaugusių reklonų buvo priskirti „per mažų“ kategorijai (mėlyna spalva) (**19 pav.**). 26 reklonus Clonepix 2 priskyrė „tinkamų“ klonų kategorijai (žalia spalva), 60 – „per arti augančių“ klonų kategorijai (rožinė spalva) (**19 pav.**). Iš viso buvo izoliuoti 86 „tinkamų“ ir „per arti augančių“ kategorijoms priskirti klonai ir perkelti į atskirus šulinėlius 96 šulinėlių plokštelėje. 3 paras ląstelės augintos 9 % FVS DMEM terpėje su makrofagais. Toliau buvo atlikta netiesioginė ELISA antikūnų prieš CNX nustatymui, siekiant identifikuoti produktyvius reklonus (**20 pav.**).



20 pav. Izoliuotų 3H3 reklonų ELISA rezultatai. Teigiama kontrolė – PAK prieš CNX. Neigiama kontrolė – 9 % FVS DMEM terpė. Punktyrinė linija žymi ribinę vertę, apskaičiuotą pagal neigiamos kontrolės (n=3) vidurkį + 3 standartiniai nuokrypiai.

ELISA rezultatai parodė, kad iš 86 izoliuotų reklonų visi pasižymėjo antikūnų prieš CNX sekrecija (**20 pav.**). Šį rezultatą pavyko pasiekti vykdant vos pirmą 3H3 klonu reklonavimą klampioje terpėje – tai parodo, kad po hibridizacijos į klampią terpę išsėtos ląstelės augo ir formavo klonus atskirai viena nuo kitos ir nesimaišė. Šiam teiginiui patvirtinti buvo tiriami 8-ių atsitiktinių 3H3 reklonų į augimo terpę sekretuojamų antikūnų izotipai. ELISA antikūnų izotipų nustatymui rezultatai parodė, kad visų klonų gaminami antikūnai yra IgM izotipo. Dėl aukštos molekulinės masės (≈ 900 kDa) ir polinkio agreguoti šio izotipo antikūnai yra nestabilūs, todėl retai naudojami kaip monokloniniai antikūnai. Dėl šios priežasties hibridomos 3H3 reklonai nebuvo toliau kultivuojami.

Pelės imunizacijai buvo naudojamas žmogaus CNX baltymas. Žmogaus ir pelės CNX aminorūgščių seka sutampa 94 %, todėl šie du baltymai yra homologai (Tjoelker *et al.*, 2002). Pelės imuninė sistema prastai reaguoja į antigeną, kuris labai panašus į pelės baltymą, todėl susidaro mažai plazminių ląstelių gaminančių antikūnus. Tikėtina, kad dėl žmogaus ir pelės CNX baltymų panašumo iš 413 izoliuotų klonų vos 1 klonas pasižymėjo antikūnų prieš CNX gamyba. Nepaisant to, šį kloną pavyko sėkmingai reklonuoti į klampią terpę ir izoliuoti 86 gyvybingus reklonus, pasižyminčius antikūnų prieš tikslinį CNX baltymą gamyba. Atlikus hibridizuotų ląstelių sėjimą į hibridomoms selektyvią klampią terpę buvo pastebėta, kad ląstelės išlieka gyvybingos, proliferuoja ir formuoja klonus, kuriuos pavyksta sėkmingai izoliuoti iš klampios terpės ir kultivuoti skystoje terpėje.

IŠVADOS

1. Atlikus 5H6, 12E12 ir 25E6 hibridomų linijų sėjimus į skirtingos MC koncentracijos klampią terpę buvo nustatyta optimali 1 % MC koncentracija hibridomų auginimui ir klonavimui.
2. Atlikus hibridomų sėjimus skirtingomis koncentracijomis į 1 % MC klampią terpę buvo nustatyta optimali ląstelių sėjimo koncentracija – 2×10^4 ląst./šul., kurią naudojant užauga daugiausiai apvalios formos klonų, išlaikančių tinkamą atstumą nuo kitų klonų.
3. Taikant hibridomų technologiją buvo sulietos CNX baltymu imunizuotos pelės blužnies ląstelės su mielomos ląstelėmis ir išsėtos į hibridomoms selektyvią klampią terpę, kurioje susiformavo monoklonai. Tai rodo, kad pavyko apjungti hibridomų atrankos ir klonavimo procesus.
4. Clonpix 2 sistema buvo izoliuota 413 hibridomų klonų, iš kurių 1 klonas (3H3) pasižymėjo antikūnų prieš CNX baltymą gamyba. 3H3 klono ląstelių reklonavimas į klampią terpę leido izoliuoti 86 reklonus, iš kurių visi gamino antikūnus prieš CNX baltymą. Tai parodo klampios terpės naudojimo efektyvumą siekiant izoliuoti ląstelių monoklonines populiacijas.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Olgerd Babkin

Bakalauro baigiamasis darbas

KLAMPIOS TERPĖS HIBRIDOMŲ KLONAVIMUI IR ATRANKAI OPTIMIZAVIMAS

SANTRAUKA

Hibridomų technologijoje daugiausiai darbo ir laiko resursų reikalaujantis etapas yra ląstelių atranka ir monokloninės populiacijos izoliavimas. Vienas iš tradicinių hibridomų klonavimo būdų yra klonavimas serijiniu skiedimu, kuris reikalauja daug darbo, pakartojimų bei negarantuoja, kad izoliuota ląstelių populiacija bus monokloniška. Ląstelių klonavimas klampioje terpėje ir užaugusių klonų izoliavimas rankiniu būdu ar robotizuotomis sistemomis yra kitas būdas atrinkti monoklonines populiacijas. Klampioje terpėje imobilizuotos ląstelės yra atskiriamos viena nuo kitos, todėl yra užkertamas kelias ląstelių maišymuisi ir skatinamas klonų augimas iš vienos ląstelės.

Šio darbo tikslas yra sukurti ir optimizuoti ekonomiškai patrauklų klampios terpės gamybos protokolą hibridomų atrankai ir klonavimui. Metilceliuliozės (MC) pagrindu pagamintoje klampioje terpėje buvo klonuojamos skirtingos hibridomų linijos. Hibridomas sėjant į skirtingos MC koncentracijos klampias terpes buvo siekiama nustatyti optimalią MC koncentraciją, prie kurios formuojasi daugiausiai apvalios formos gyvybingų klonų. Skirtingu tankiu į klampią terpę sėjant hibridomas buvo nustatoma optimali ląstelių sėjimo koncentracija.

Remiantis trijų stabilizuotų hibridomų linijų (5H6, 12E12 ir 25E6) sėjimų rezultatais buvo nustatyta optimali 1 % MC koncentracija klampios terpės gamybai bei rekomenduojama ląstelių sėjimo 6 šulinėlių plokštelėje 2×10^4 ląstelių į šulinėlį koncentracija. Sulietų ląstelių išsėjimas į klampią terpę su HAT atrankos sistemos komponentais leido hibridomų atranką ir klonavimą vykdyti vienu metu. Hibridomų atrankos ir klonavimo apjungimas į vieną tolygų procesą leido sutaupyti laiko ir finansinių resursų reagentams. Remiantis IFA rezultatais galima teigti, kad klampioje terpėje auginamos hibridomos gamina antikūnus prieš tikslinius antigenus. Klampios terpės pritaikymo monokloninių populiacijų atrankoje potencialas jau dabar yra išnaudojamas laboratorijoje, kurioje rengtas šis darbas.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Olgerd Babkin

Bachelor's thesis

**OPTIMIZATION OF SEMI-SOLID MEDIA FOR HYBRIDOMA CLONING AND
SELECTION**

SUMMARY

In hybridoma technology, the most labor and time-consuming stage is cell selection and isolation of the monoclonal population. One of the traditional methods for cloning hybridomas is limiting dilution cloning, that requires a lot of work, repetitions, and does not guarantee that the isolated cell population will be monoclonal. Cell cloning in a semi-solid medium and isolation of grown clones manually or by robotic systems is another way to select monoclonal populations. Cells immobilized in a semi-solid medium are separated from each other, thus preventing cell mixing and promoting clonal growth from a single cell.

The aim of this work is to develop and optimize a cost-effective semi-solid medium production protocol for hybridoma selection and cloning. Different hybridoma lines were cloned in a semi-solid medium made on the basis of methylcellulose (MC). By seeding hybridomas into semi-solid media with different MC concentrations, the optimal MC concentration was sought at which the highest number of viable round-shaped clones would form. By seeding hybridomas at different densities into the semi-solid medium, the optimal cell seeding concentration was determined.

Based on the seeding results of three stabilized hybridoma lines (5H6, 12E12, and 25E6), the optimal 1% MC concentration for semi-solid medium production and the recommended cell seeding into 6-well plates 2×10^4 cells/well concentration were determined. Seeding of fused cells into a semi-solid medium with components of the HAT selection system allowed hybridoma selection and cloning to be carried out simultaneously. Combining the processes of hybridoma selection and cloning into one streamlined process allowed for the savings of time and financial resources for reagents. Based on the ELISA results, it can be stated that hybridomas grown in a semi-solid medium produce antibodies against target antigens. The potential of the semi-solid medium for the selection of monoclonal populations is already being utilized for hybridoma cloning in the laboratory, where this work has been conducted.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Martynui Simanavičiui už įgytas teorines ir praktines žinias, operatyvią pagalbą rengiant baigiamąjį darbą, supratingumą, kantrybę bei pasitikėjimą.

Dėkoju profesorei Aurelijai Žvirblienei už suteiktą galimybę saugiai dirbti šioje laboratorijoje bei imunologijos srities teorines žinias.

Taip pat norėčiau padėkoti laboratorijos kolegoms ir kolegėms Agnei Rimkutei, Dainiui Gudui, Kristinai Mašalaitei bei Vytautui Rudokui už pagalbą sprendžiant darbo laboratorijoje metu iškylusias problemas.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Adeniyi, O.K., Ngqinambi, A., Mashazi, P.N., 2020. Ultrasensitive detection of anti-p53 autoantibodies based on nanomagnetic capture and separation with fluorescent sensing nanobioprobe for signal amplification. *Biosens. Bioelectron.* 170, 112640. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112640>
2. Akizawa, T., Kitao, T., Watanabe, T., Imamura, K., Tsurumi, T., Suma, Y., Eiga, S., 1987. Development of noncomplement activating membrane of regenerated cellulose for hemodialysis. *Jpn J Artif Organs* 16, 822.
3. Albanell, J., Codony, J., Rovira, A., Mellado, B., Gascón, P., 2003. Mechanism of Action of Anti-HER2 Monoclonal Antibodies: Scientific Update on Trastuzumab and 2C4, in: Llombart-Bosch, A., Felipo, V. (Eds.), *New Trends in Cancer for the 21st Century: Proceedings of the International Symposium on Cancer: New Trends in Cancer for the 21st Century*, Held November 10–13, 2002, in Valencia, Spain. Springer US, Boston, MA, pp. 253–268. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0081-0_21
4. Babcook, J.S., Leslie, K.B., Olsen, O.A., Salmon, R.A., Schrader, J.W., 1996. A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 7843–7848. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7843>
5. Bagacean, C., Zdrengeha, M., Tempescul, A., Cristea, V., Renaudineau, Y., 2016. Anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia: from uncertainties to promises. *Immunotherapy* 8, 569–581. <https://doi.org/10.2217/imt-2015-0015>
6. Barnes, L.M., Moy, N., Dickson, A.J., 2006. Phenotypic variation during cloning procedures: Analysis of the growth behavior of clonal cell lines. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 530–537. <https://doi.org/10.1002/bit.20856>
7. BioSpace.com [<https://www.biospace.com/>]. Biopharmaceuticals Market Size To Hold USD 856.1 Bn By 2030. <https://www.biospace.com/article/biopharmaceuticals-market-size-to-hold-usd-856-1-bn-by-2030/>
8. Boye, J., Elter, T., Engert, A., 2003. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann. Oncol.* 14, 520–535. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg175>
9. Brady, J., Dürig, T., Lee, P.I., Li, J.-X., 2017. Chapter 7 - Polymer Properties and Characterization, in: Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G.G.Z., Yu, L., Mantri, R.V. (Eds.), *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 181–223. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00007-8>
10. Brannon-Peppas, L., 1990. Preparation and Characterization of Crosslinked Hydrophilic Networks, in: Brannon-Peppas, Lisa, Harland, R.S. (Eds.), *Studies in Polymer Science, Absorbent Polymer Technology*. Elsevier, pp. 45–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-88654-5.50008-X>
11. Browne, S.M., Al-Rubeai, M., 2007. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.* 25, 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.07.002>
12. Burdock, G.A., 2007. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2341–2351. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.011>
13. Caron, A.W., Nicolas, C., Gaillet, B., Ba, I., Pinard, M., Garnier, A., Massie, B., Gilbert, R., 2009. Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins. *BMC Biotechnol.* 9, 42. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-42>

14. Carter, P., 2001. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1, 118–129. <https://doi.org/10.1038/35101072>
15. Choi, H.S., Kim, W., Ryu, C.J., 2014. Antibody approaches to prepare clinically transplantable cells from human embryonic stem cells: Identification of human embryonic stem cell surface markers by monoclonal antibodies. *Biotechnol. J.* 9, 915–920. <https://doi.org/10.1002/biot.201300495>
16. Choi, Y., Chung, Y.-H., 1999. A Study on Apoptosis of HGPRT- Mouse Myeloma Cell Induced by Aminopterin, a de novo Pathway Blocking Agent. *Korean J. Immunol.* 25–34.
17. Coiffier, B., 2007. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 26, 3603–3613. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210376>
18. Cole, L.A., 2009. Human chorionic gonadotropin tests. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 9, 721–747. <https://doi.org/10.1586/erm.09.51>
19. Davis, J.M., 2004. Basic cell culture: a practical approach, in: *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. pp. xxv, 381–xxv, 381.
20. Davis, J.M., Pennington, J.E., Kubler, A.-M., Conscience, J.-F., 1982. A simple, single-step technique for selecting and cloning hybridomas for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 50, 161–171. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(82\)90222-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(82)90222-8)
21. Dharshanan, S., Chong, H., Hung, C.S., Zamrod, Z., Kamal, N., 2011. Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized monoclonal antibody using Clone Pix FL system and the correlation between exterior median intensity and antibody productivity. *Electron. J. Biotechnol.* 14, 8–8.
22. Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M.A.V., Legrand, J., 2003. Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *J. Food Eng.* 58, 227–238. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00372-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00372-2)
23. Forthal, D.N., 2014. Functions of Antibodies. *Microbiol. Spectr.* 2, 10.1128/microbiolspec.aid-0019–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.aid-0019-2014>
24. Franz, G., 1986. Polysaccharides in pharmacy, in: Dušek, K. (Ed.), *Pharmacy/Thermomechanics/Elastomers/Telechelics, Advances in Polymer Science*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–30. https://doi.org/10.1007/3-540-15830-8_1
25. Freedman, V., 1974. Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3, 355–359. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(74\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(74)90050-6)
26. Freedman, V.H., Shin, S., 1974. Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3, 355–359. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(74\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(74)90050-6)
27. Ganguly, S., Wakchaure, R., n.d. Hybridoma technology: a brief review on its diagnostic and clinical significance.
28. Glicksman, M., 1963. Utilization of Synthetic Gums in the Food Industry, in: *Advances in Food Research*. Elsevier, pp. 283–366. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60010-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60010-5)
29. Greenfield, E.A., 2019. Single-Cell Cloning of Hybridoma Cells by Limiting Dilution. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot103192>
30. Grover, J.A., 1993. CHAPTER 18 - METHYLCELLULOSE AND ITS DERIVATIVES, in: Whistler, R.L., Bemiller, J.N. (Eds.), *Industrial Gums (Third Edition)*. Academic Press, London, pp. 475–504. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092654-4.50022-X>
31. Ham, R.G., 1972. Chapter 2 Cloning of Mammalian Cells, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 37–74. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60709-8](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60709-8)
32. Hnasko, R., Lin, A., McGarvey, J.A., Stanker, L.H., 2011. A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 726–731. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.005>

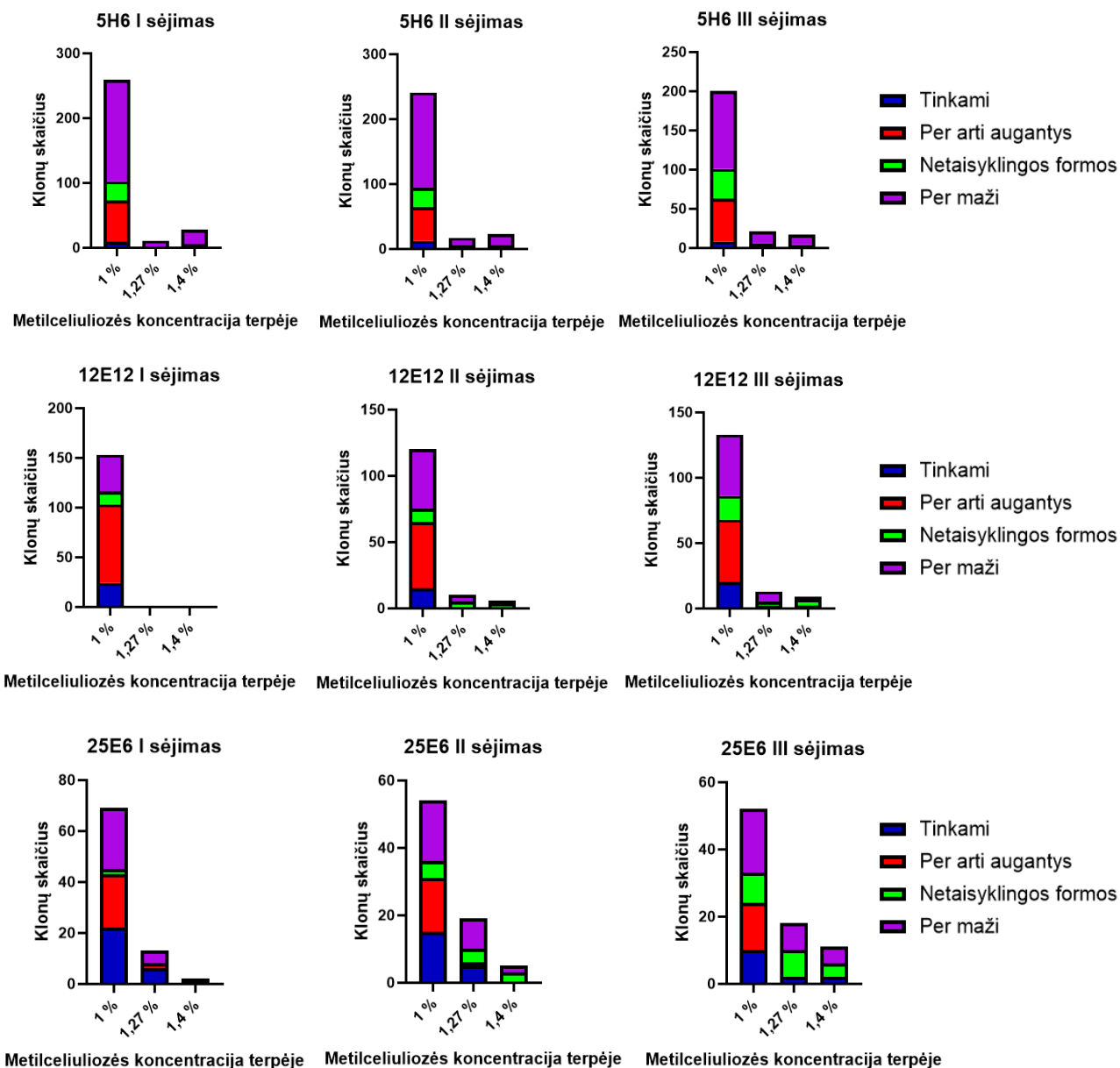
33. Hnasko, R.M., Stanker, L.H., 2015. Hybridoma Technology, in: Hnasko, R. (Ed.), *ELISA, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 15–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_2
34. Ito, T., Ishikawa, Y., Okano, S., Hattori, T., Fujii, R., Shinozawa, T., Shibuya, A., 1987. Cloning of Human Neuroblastoma Cells in Methylcellulose Culture. *Cancer Res.* 47, 4146–4149.
35. Jefferis, R., 2019. Monoclonal antibodies in immunotherapy. *J. Prescr. Pract.* 1, 26–31. <https://doi.org/10.12968/jprp.2019.1.1.26>
36. Kennett, R.H., Jonak, Z.L., Bechtol, K.B., 1980. Monoclonal Antibodies against Human Tumor-Associated Antigens, in: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (Eds.), *Monoclonal Antibodies: Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*. Springer US, Boston, MA, pp. 155–168. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7505-4_10
37. Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
38. Kojima, N., Takeuchi, S., Sakai, Y., 2012. Rapid aggregation of heterogeneous cells and multiple-sized microspheres in methylcellulose medium. *Biomaterials* 33, 4508–4514. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.065>
39. Kuhn, C., Weiner, H.L., 2016. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Immunotherapy* 8, 889–906. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0049>
40. Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. (Yijuan), Kiss, R., Amanullah, A., 2010. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs* 2, 466–479. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>
41. Luckenbach, G.-A., 1988. Some Recent Aspect on Hybridoma Technology, in: Mayr, W.R. (Ed.), *Advances in Forensic Haemogenetics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 267–267. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73330-7_55
42. Mann, C.J., 2007. Rapid isolation of antigen-specific clones from hybridoma fusions. *Nat. Methods* 4, i–ii. <https://doi.org/10.1038/nmeth1028>
43. Marder, P., Maciak, R.S., Fouts, R.L., Baker, R.S., Starling, J.J., 1990. Selective cloning of hybridoma cells for enhanced immunoglobulin production using flow cytometric cell sorting and automated laser nephelometry. *Cytometry* 11, 498–505. <https://doi.org/10.1002/cyto.990110408>
44. Masahiro, N., Megumi, I., Kazuhiko, J., Hitoshi, S., Takaichi, A., 1980. Sustained urinary excretion of sulfamethizole following oral administration of enteric coated microcapsules in humans. *Int. J. Pharm.* 4, 291–298. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(80\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0378-5173(80)90004-6)
45. Mathern, D.R., Heeger, P.S., 2015. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1636. <https://doi.org/10.2215/CJN.06230614>
46. Mitra, S., Tomar, P.C., 2021. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 19, 159. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6>
47. Miyamoto, T., Takahashi, S., Ito, H., Inagaki, H., Noishiki, Y., 1989. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *J. Biomed. Mater. Res.* 23, 125–133. <https://doi.org/10.1002/jbm.820230110>
48. Nasatto, P., Pignon, F., Silveira, J., Duarte, M., Nosedá, M., Rinaudo, M., 2015. Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications. *Polymers* 7, 777–803. <https://doi.org/10.3390/polym7050777>
49. Pan, P., Svirskis, D., Waterhouse, G.I.N., Wu, Z., 2023. Hydroxypropyl Methylcellulose Bioadhesive Hydrogels for Topical Application and Sustained Drug Release: The Effect of Polyvinylpyrrolidone on the Physicomechanical Properties of Hydrogel. *Pharmaceutics* 15, 2360. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092360>

50. Park, J.-S., Ruckenstein, E., 2001. Viscoelastic properties of plasticized methylcellulose and chemically crosslinked methylcellulose. *Carbohydr. Polym.* 46, 373–381.
[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00336-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00336-2)
51. Parray, H.A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., Kumar, R., 2020. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int. Immunopharmacol.* 85, 106639. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>
52. Podczek, F., Jones, B.E., 2004. *Pharmaceutical Capsules*. Pharmaceutical Press.
53. Puck, T.T., Marcus, P.I., 1955. A RAPID METHOD FOR VIABLE CELL TITRATION AND CLONE PRODUCTION WITH HELA CELLS IN TISSUE CULTURE: THE USE OF X-IRRADIATED CELLS TO SUPPLY CONDITIONING FACTORS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 41, 432–437. <https://doi.org/10.1073/pnas.41.7.432>
54. Rahman, Md.M., Roy, S., Das, S., Jha, M., Begum, T., Ahsan, M.Q., Islam, M.S., Reza, M., 2011. Evaluation of Various Grades of Hydroxypropylmethylcellulose Matrix Systems as Oral Sustained Release Drug Delivery systems. *J. Pharm. Sci. Res.* 03, 930–938.
55. Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., 2014. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet. Pathol.* 51, 42–87. <https://doi.org/10.1177/0300985813505879>
56. Rivera, F., Eugenia Vega-Villegas, M., Lopez-Brea, M.F., Marquez, R., 2008. Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol.* 47, 9–19.
<https://doi.org/10.1080/02841860701704724>
57. Sabayasachi G., 2024. Antibody Market Outlook for 2024 to 2034.
futuremarketinginsights.com. <https://www.futuremarketinsights.com/reports/antibodies-market>
58. Sanford, K.K., Earle, W.R., Likely, G.D., 1948. The Growth in Vitro of Single Isolated Tissue Cells. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 9, 229–246. <https://doi.org/10.1093/jnci/9.3.229>
59. Schneier, M., Razdan, S., Miller, A.M., Briceno, M.E., Barua, S., 2020. Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. *Biotechnol. Bioeng.* 117, 2588–2609. <https://doi.org/10.1002/bit.27362>
60. Shi, Z., Zhu, Y., Zhang, J., Chen, B., 2022. Monoclonal antibodies: new chance in the management of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 27, 642–652.
<https://doi.org/10.1080/16078454.2022.2074704>
61. Shokri, J., Adibkia, K., Shokri, J., Adibkia, K., 2013. Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries, in: *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/55178>
62. Shulman, M., Wilde, C.D., Köhler, G., 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276, 269–270. <https://doi.org/10.1038/276269a0>
63. Siepmann, J., Peppas, N.A., 2012. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, MOST CITED PAPERS IN THE HISTORY OF ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS: A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL 64, 163–174.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.028>
64. Spencer, P.C., Schmidt, B., Samtleben, W., Bosch, T., Gurland, H.J., 1985. EX VIVO MODEL OF HEMODIALYSIS MEMBRANE BIOCOMPATIBILITY. *ASAIO J.* 31, 495.
65. Staszewski, R., 1990. Murphy's law of limiting dilution cloning. *Stat. Med.* 9, 457–461.
<https://doi.org/10.1002/sim.4780090416>
66. Stills, H.F., 2012. Chapter 11 - Polyclonal Antibody Production, in: Suckow, M.A., Stevens, K.A., Wilson, R.P. (Eds.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, American College of Laboratory Animal Medicine. Academic Press, Boston, pp. 259–274.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00011-0>

67. Sturm, T., Sautter, B., Wörner, T.P., Stevanović, S., Rammensee, H.-G., Planz, O., Heck, A.J.R., Aebersold, R., 2021. Mild Acid Elution and MHC Immunoaffinity Chromatography Reveal Similar Albeit Not Identical Profiles of the HLA Class I Immunopeptidome. *J. Proteome Res.* 20, 289–304. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00386>
68. Thiel, K.W., Devor, E.J., Filiaci, V.L., Mutch, D., Moxley, K., Alvarez Secord, A., Tewari, K.S., McDonald, M.E., Mathews, C., Cosgrove, C., Dewdney, S., Aghajanian, C., Samuelson, M.I., Lankes, H.A., Soslow, R.A., Leslie, K.K., 2022. TP53 Sequencing and p53 Immunohistochemistry Predict Outcomes When Bevacizumab Is Added to Frontline Chemotherapy in Endometrial Cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* 40, 3289–3300. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02506>
69. Walsh, G., 2006. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat. Biotechnol.* 24, 769–776. <https://doi.org/10.1038/nbt0706-769>
70. Walters, R.A., Hutson, J.Y., Burchill, B.R., 1970. A new method of cloning mammalian tissue culture cells in suspension. *J. Cell. Physiol.* 76, 85–88. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040760112>
71. Wurm, F.M., 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 1393–1398. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>
72. Yelton, D.E., Diamond, B.A., Kwan, S.-P., Scharff, M.D., 1979. Fusion of Mouse Myeloma and Spleen Cells, in: Melchers, F., Potter, M., Warner, N.L. (Eds.), *Lymphocyte Hybridomas*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–7. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67448-8_1
73. Zahavi, D., Weiner, L., 2020. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies* 9, 34. <https://doi.org/10.3390/antib9030034>
74. Zobel, M., 1976. Toxicological Evaluation of Some Food Additives Including Anticaking Agents, Antimicrobials, Antioxidants, Emulsifiers and Thickening Agents. *Who Food Additives Series, No. 5*. 520 Seiten. Geneva 1974. Preis: Sw. fr. 23,—. *Food Nahr.* 20, 681–682. <https://doi.org/10.1002/food.19760200616>
75. Zola, H., 2010. Monoclonal Antibodies, in: *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001205.pub3>

PRIEDAI

Priedas I. Skirtingos MC koncentracijos terpėse užaugusių hibridomų klonų atitikimas klonų kategorijoms.



Priedas II. Klampioje terpėje užaugusių hibridomų klonų atitikimas klonų kategorijoms sėjant skirtingas ląstelių koncentracijas.

