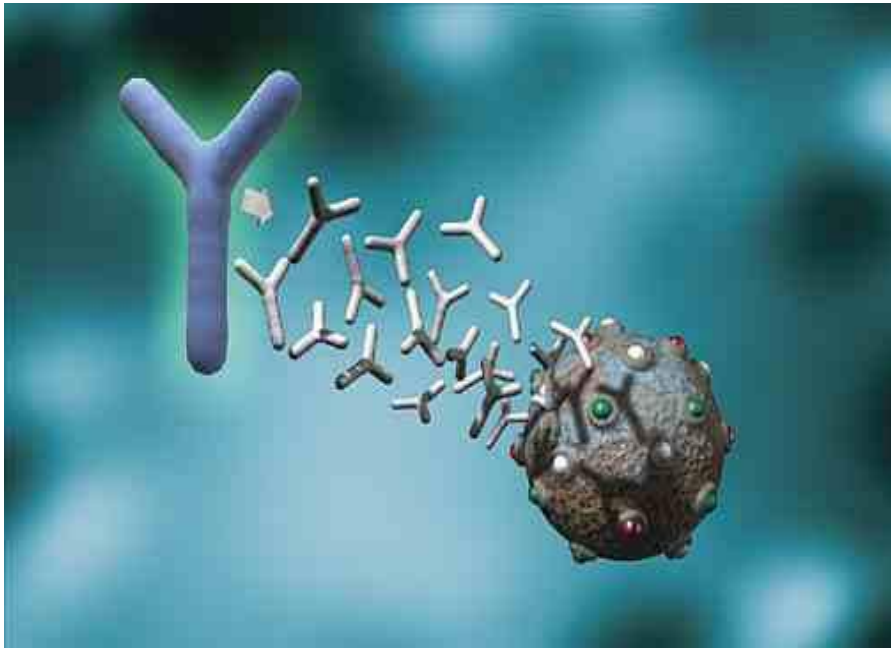


Производство МОНОКЛОНАЛЬНЫ х антител



**Лектор: асс., к.б.н.
Караева Альбина Маирбековна**





ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Иммуноферментный анализ (ИФА)

**2. Моноклональные антитела (МкАТ).
История создания МкАТ.**

3. Этапы производства МкАТ.

**4. Современная номенклатура
МкАТ.**



Иммунная система –

это система органов и клеток, реагирующая на генетически чужеродную информацию и участвующая в защите макроорганизма от такой информации.

Состоит из 3 компонентов:

- 1. Клеточный;**
- 2. Молекулярный;**
- 3. Генетический.**






Иммунопрофилактика –


комплекс противоэпидемических мероприятий, направленный на предупреждение инфекционных болезней и осуществляемый путем иммунизации.





Иммуноферментный анализ (ИФА) - это лабораторное исследование, основанное на реакции «антиген-антитело». Суть этого лабораторного метода - выявление специфических антител с помощью специальных биохимических реакций, которые помогают определить присутствие или отсутствие антител и их количество. **Методом ИФА** можно определить уровень гормонов, иммуноглобулинов, иммунологических комплексов и других БАВ





Материалом для проведения иммуноферментного анализа является кровь, взятая из вены.

Помимо крови для ИФА могут понадобиться околоплодные воды и материал стекловидного тела.





В качестве «маркеров» применяются

1. радиоактивные метки (это радиоиммунный анализ (РИА, с использованием радиоактивных атомов – тритий, радиоактивный иод и другие).

2. ферментные метки (если ферменты стабильны, активны и действуют в минимальных концентрациях).
Суть: субстрат превращается в продукт и далее обнаруживается фотометрическим методом.

3. Субстратные метки (АТФ и НАД), которые «пришиваются» к молекуле антигена через адениновый остаток и сохраняют способность взаимодействия с ферментом.

Для введения ферментативной метки применяются химические, биохимические, иммунологические способы.



Принцип проведения иммуноферментного анализа крови

Непрямой иммуноферментный анализ (indirect ELISA)

Метод непрямого иммуноанализа характеризуется осуществлением 3-х стадийного процесса, на первой стадии которого антиген адсорбируется на специально подготовленном пластике, на второй с антигеном взаимодействуют специфичные к нему антитела, а на третьей в систему вводят антивидовые антитела, конъюгированные с ферментом, обуславливающим проведение индикаторной ферментативной реакции. В данной методике в качестве фермента используют пероксидазу хрена. Реакция проводится в специальных 96-луночных планшетах.

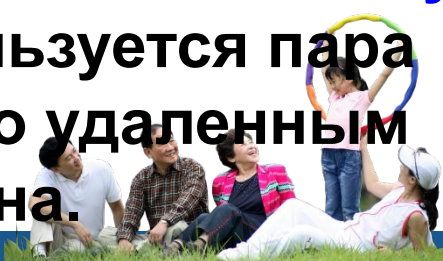


Прямой иммуноферментный анализ (direct ELISA)

Методика прямого иммуноанализа имеет лишь небольшие отличия по сравнению с методикой непрямого иммуноанализа. Так, стадии I и II одинаковы в обоих типах анализа. Отличие заключается в том, что в прямом варианте иммуноанализа на стадии III используют специфичные антитела, конъюгированные с ферментной меткой. При необходимости также можно проводить раститровку специфичных антител, конъюгированных с ферментной меткой, аналогично описанному ранее для неконъюгированных антител. Стадия IV опускается, а дальнейшие стадии (V-VII) проводятся аналогично описанному выше для непрямого варианта иммуноанализа.

Иммуноанализ сэндвич-типа (Sandwich-type immunoassay)

В данном варианте иммуноанализа используется пара антител, специфичных к пространственно удаленным эпитопам исследуемого антигена.





Расшифровка результатов анализа

Иммуноферментный анализ крови позволяет
выявить антитела разных видов.
Это иммуноглобулины класса А, М, G.



Преимущества иммуноферментного анализа

- ❖ высокая чувствительность и точность метода;
- ❖ возможность проведения ранней диагностики, поскольку ИФА позволяет определять классы иммуноглобулинов при анализе;
- ❖ прослеживание динамики инфекционного процесса;
- ❖ возможность получения быстрого ответа;
- ❖ удобство метода.

Недостатки

Основным недостатком иммуноферментного анализа является тот факт, что в редких случаях метод выдает ложноотрицательные или ложноположительные результаты.





Моноклональные антитела (МкАТ) — это


антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы.

МкАТ могут быть выработаны на почти любое вещество (в основном белки МкАТ могут быть выработаны на почти любое вещество (в основном белки и полисахариды), которое антитело будет специфически связывать.

МкАТ широко используются в биохимии



М. АТ




МкАТ – химически гомогенные по структуре антитела, строго специфичные в отношении одного **ЭПИТОПА**, синтезируемые клонированными **гибридомами** – клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломными опухолевыми клетками, способными к неорганическому росту.



Эпитоп – фрагмент
молекулы антигена,
локализующийся внутри
или на поверхности
молекулы, определяющий
его специфичность.





Гибридома (клетка гибридная) –
гибридная клеточная линия,
полученная при слиянии
нормальных антителообразующих
клеток и миеломных клеток.





В 1895 г. осуществлена первая попытка применения антител для лечения онкологических заболеваний.

В 1975 г. лауреаты Нобелевской премии Жорж Келер и Сезар Мильштейн впервые предложили процесс получения МкАТ.

В 1988 г. Грег Винтер разработал специальную методику «очеловечивания» моноклональных антител.






Этапы получения гибридом



- 1. Селекция миеломных клеток.**
- 2. Иммунизация мышей антигеном.**
- 3. Получение В-лимфоцитов.**
- 4. Гибридизация клеток миеломы и В-лимфоцитов.**
- 5. Селекция гибридом на среде ГАТ.**
- 6. Определение антителообразующей способности гибридом.**



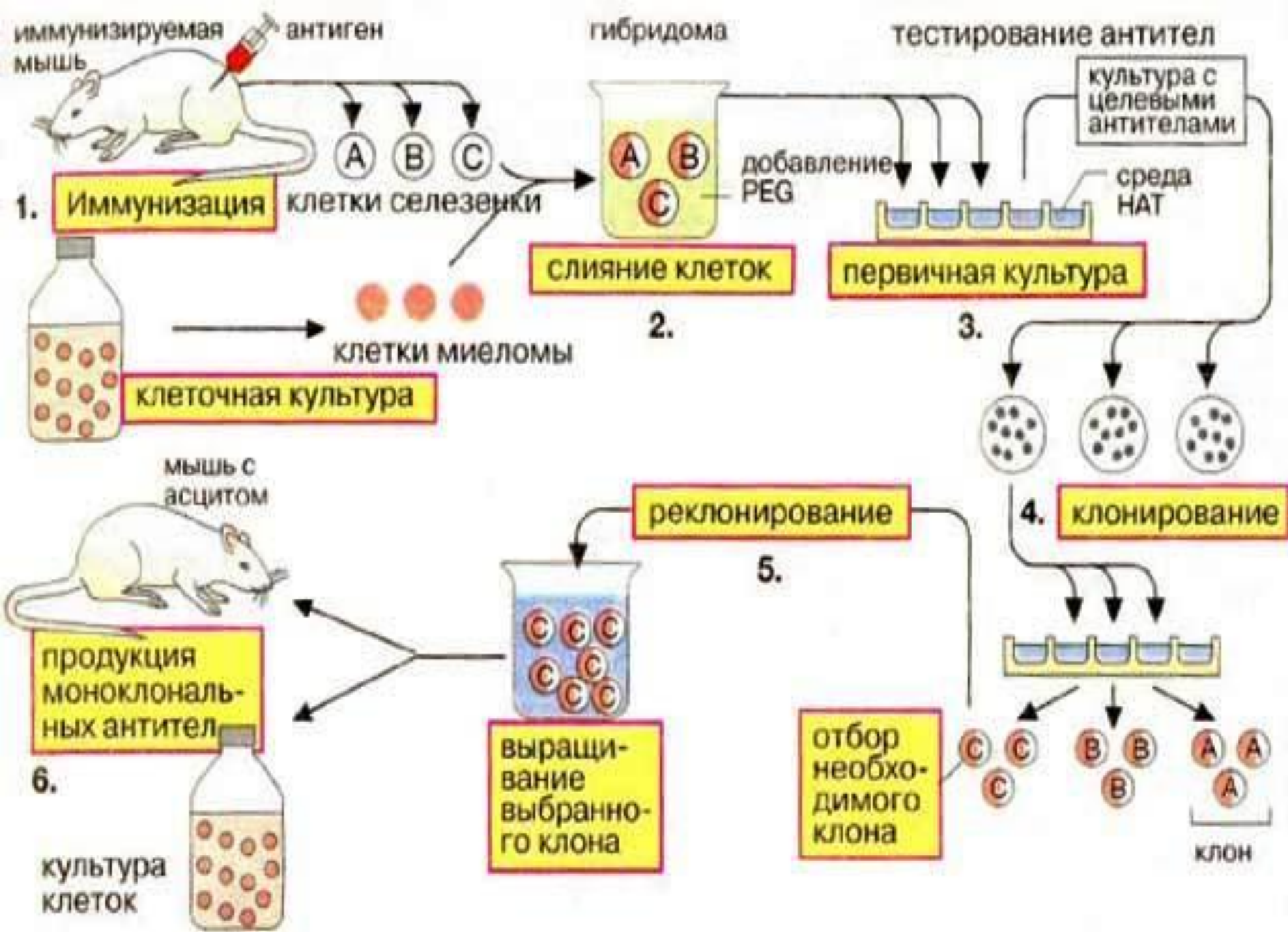


7. Накопление клона гибридом, синтезирующих моноклональные антитела заданной специфичности (к известному антигену).

8. Крупномасштабное культивирование гибридом и накопление моноклональных антител.

9. Концентрирование, выделение и очистка МкАТ.







1. Селекция миеломных клеток




В-лимфоциты и миеломные клетки выделяют из мышей и крыс.

Клетки миеломы (плазмоциты) - это злокачественно трансформированные лимфоидные клетки костного мозга.

Клетки миеломы - клоны, образованные при делении единичных измененных опухолевых В-клеток, синтезируемые МкАТ неизвестной специфичности и обладающие способностью к неограниченному размножению.





**Клетки плазмоцитомы для
гибридизации получают путем
мутагенеза. Должны обладать
устойчивостью к токсичным
аналогам азотистых оснований,
входящих в состав ДНК.**



2. Иммунизация мышей антигеном



Иммунизация стимулирует формирование иммунного ответа и выраженное антителообразование.

АНТИГЕН ВВОДЯТ В/В, В/Б, П/К С АДЬЮВАНТОМ (В-ВОМ, УСИЛИВАЮЩИМ ИММУНОГЕННОСТЬ АНТИГЕНОВ) ИЛИ БЕЗ НЕГО В НАРАСТАЮЩЕЙ ДОЗЕ.





3. Получение клеток селезенки



Лимфоидная ткань селезенки мыши способствует накоплению плазматических клеток, синтезирующих антитела.

Через 4 дня после инъекции антигена мышей убивают, селезенку извлекают, измельчают и готовят суспензию, содержащую аминокислоты, витамины, углеводы, неорганические соли.



4. Гибридизация клеток миеломы и В-лимфоцитов.

Лимфоциты селезенки и клетки миеломы смешивают, осаждают центрифугированием, готовят суспензию, выдерживают 30-40 минут при 37⁰С, повторно центрифугируют.

Для слияния клеток добавляют к среде ПЭГ и СаСl₂, обеспечивающие перераспределение мембранных белков, обеспечивая контакт и слияние клеток.



5. Селекция гибридом на среде ГАТ

Осадок клеток ресуспендируют в среде ГАТ, содержащей:

гипоксантин (Г),

аминоптерин (А),

тимидин (Т),

разливают в лунки микропланшет и инкубируют при 37⁰С в атмосфере


СО₂ в течение 10-16 дней.





**Каждые 4 дня проводят
замену среды в лунках.**






**Аминофолиевая кислота
оказывает цитостатическое
действие, ингибирует биосинтез
пуринов, тимина и др.
аминокислот.**

**Гипоксантин и тимидин
добавляют в среду в качестве
предшественников пуринов и
пиримидинов.**






1. Неслившиеся лимфоциты отмирают после гибридизации, т. к. не способны выживать *in vitro*.

2. Выживают непрерывно растущие клоны гибридных клеток.

3. Подсчет количества клонов в лунках проводят с помощью микроскопа.





6. Определение антителообразующей способности гибридом

Идентификацию клеток, синтезирующих антитела, проводят с помощью гибридомной технологии. Наличие антител определяют в надосадочных фракциях культуральной среды в лунках микропланшет. Отбирают 50 мкл среды. Определение антител проводят методом радиоиммуноанализа (РИА) или иммуноферментного анализа (ИФА)






7. Клонирование гибридом

**Гибридомы клонируют методом
предельных разведений.**

- 1. Клетки ресуспендируют в среде с добавлением сыворотки крови плода коровы и затем разводят этой же средой.**
- 2. В каждую лунку должна попасть клетка, содержащая 1 клон гибридом.**





8. Накопление клеток, синтезирующих МкАТ

**Гибридомы легко
культивируются в
замороженном состоянии в
жидком азоте при -70°C в среде,
содержащей сыворотку крови и
1% диметилсульфоксид.**



9. Крупномасштабное культивирование гибридом и накопление МкАТ:

Способы:

1. Инкубирование в аппаратах эрлифтного типа (суспензия клеток-антителопродуцентов перемешивается путем подачи CO_2 и воздуха).
2. Совмещение эрлифтного культивирования с микрокапсулированием (гибридомы иммобилизуют на стеклянном матриксе, в капсулах агарозы; цикл культивирования – 1 месяц., выход антител – 59-250 мг/мл).



3. Мембранно-перфузионный способ

(фирма «Millipore»). Гибридомы достаточно стабильны и выход МКАТ высокий.



10. Очистка.

Современные способы разделения:

- 1. Центрифугирование;**
- 2. Мембранная
фильтрация и др.**






**В терапии опухолей используют два
типа МкАТ:**

- ❖ **простые** — МкАТ, не связанные ни с какими цитотоксическими веществами;
- ❖ **конъюгированные** — МкАТ, лечебный эффект которых обусловлен присоединенными к антителу веществами (радиоактивными частицами, цитостатиками или токсинами).






❖ ***Ритуксимаб (Ритуксан (США), Мабтера (Россия)) - первым МкАТ, применяемый в онкологии. Ритуксимаб — это химерное МкАТ (мышинный и человеческий МкАТ).***


❖ ***Алемтузумаб (Мабкэмпас, Кэмпас (Россия)) — гуманизированное МкАТ к антигену CD52. Предназначен для лечения хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) у взрослых.***






**Кэмпас используется для
уменьшения реакции
«трансплантат против
хозяина».**





❖ **Трастузумаб (Герцептин (Россия))** - первый гуманизированный антителом, зарегистрированным для лечения **солидных опухолей** - *собирательное обозначение опухолей, которые имеют определенную локализацию - место расположения, и этим отличаются от другой группы - опухолевых заболеваний кроветворной и лимфоидной ткани - лейкозов.*

Трастузумаб — рекомбинантные гуманизированные МкАТ против HER2/неи-рецепторов, принадлежащих к рецепторам эпидермального фактора роста.



❖ ***Бевацизумаб (Авастин (Россия))*** - рекомбинантный гуманизированный МкАТ, способен угнетать рост опухоли, обладает цитостатическим и цитотоксическим эффектом.

❖ ***Цетуксимаб (Эрбитукс (Россия))*** — химерное МкАТ, блокирующее активацию рецептора эпидермального фактора роста. Применяют для лечения рака толстой кишки, опухолей головы и шеи.



МкАТ как носители активных веществ

МкАТ применяют для доставки цитотоксических веществ к опухолевым клеткам.

Преимущества:

- 1. Позволяет избежать повреждения здоровых тканей;**
- 2. Усиливает противоопухолевый эффект цитостатиков.**
- 3. Способствует проникновению глубоко в ткани опухоли антител.**



Современные конъюгированные МкАТ подразделяют на следующие группы:

- ❖ **с радиоактивными частицами (радиоиммунотерапии);**
- ❖ **с цитостатиками;**
- ❖ **с токсинами (или иммунотоксинами).**

**Зарегистрировано два МкАТ,
соединенных с радиоактивными
частицами.**





Зевалин — МкАТ против CD20,
соединенное с иттрием-90.

Обеспечивает более высокую
эффективность по сравнению с
терапией простым антителом
к CD20.






Тозитумомаб (Бексар) —


мышинные МкАТ к антигену CD20, к которому прикреплен радиоактивный изотоп йода-131. Препарат получил одобрение для лечения рецидивов фолликулярных лимфом.

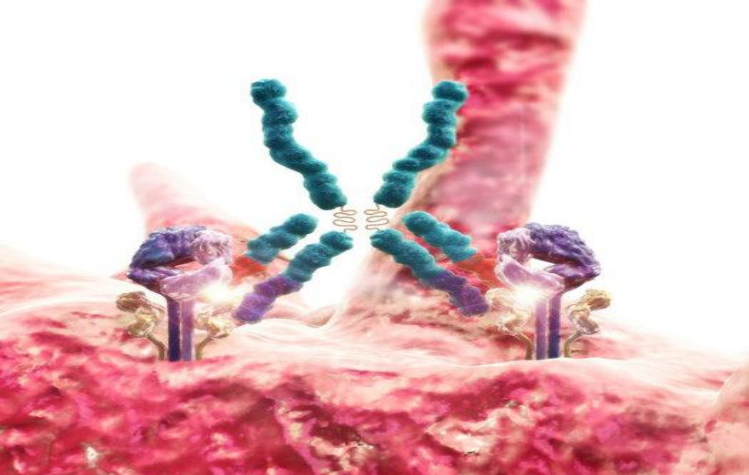




Иммунотоксины получают присоединением к МкАТ бактериальных (дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки) или растительных токсинов (рицина А или сапорина).

❖ **Милотарг** – иммунотоксин, применяемый в терапии острого миелобластного лейкоза у пожилых. Милотарг представляет собой человеческие антитела к антигену CD33.





БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!

